

Université de Montréal

**Mesure de l'activité de la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT), une enzyme impliquée dans la biogenèse des HDL, par chromatographie liquide - spectrométrie de masse (LC-MS)**

par Matthieu Blanchard

Département des Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales  
Option Générale

Août 2017

© Matthieu Blanchard, 2017

# Résumé

La lécithine : cholestérol acyltransférase, ou LCAT, est la seule enzyme plasmatique capable d'estérifier le cholestérol des lipoprotéines circulantes, une fonction importante dans la biogenèse des lipoprotéines de haute densité HDL et le transport inverse du cholestérol. Son activité est définie comme le taux d'estérification fractionnel du cholestérol libre (CL) des HDL ( $FER_{HDL}$ ). Le  $FER_{HDL}$  est un biomarqueur candidat du risque cardiovasculaire. La réaction d'estérification implique l'hydrolyse d'un acide gras estérifié à la phosphatidylcholine (PC) et son transfert au CL, résultant en la formation d'un ester de cholestérol (CE) et d'une lysophosphatidylcholine (LPC). L'objectif de ce travail était de faire la preuve de concept d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité LCAT par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS), qui permet d'identifier et quantifier simultanément tous les substrats et produits de la LCAT. Avec la méthode LC-MS, il a été possible de mesurer le  $FER_{HDL}$  comme avec la méthode enzymatique (méthode de référence pour le cholestérol libre), mais aussi des changements au niveau de lipides spécifiques. Les LPC étaient de bons marqueurs candidat de l'activité LCAT, leur abondance étant augmentée de plus de 40% suite à l'incubation. L'activité LCAT a aussi été mesurée dans des plasmas humains enrichis de plusieurs doses de LCAT humaine recombinante et les doses de 4 et 8  $\mu\text{g/mL}$  suffisaient à produire des différences significatives, comparées au plasma natif, pour 5 espèces lipidiques outre le CL: les LPC(16:0) et LPC(18:0) et les PC(14:0|18:2), PC(16:0|16:1) et PC(16:0|18:0). Enfin, l'analyse de l'activité LCAT sur des échantillons de plasma humain de la Biobanque de l'Institut de Cardiologie de Montréal (50 témoins et 50 cas ayant une maladie coronarienne athérosclérotique) a permis d'étudier la modulation des espèces lipidiques dans des échantillons plus complexes qu'un groupe de plasma. De ces lipides, la PC(34:3) était particulièrement intéressante. Son abondance était plus diminuée par l'incubation du plasma à 37°C chez les cas que chez les témoins, ce qui en fait un candidat comme biomarqueur de l'activité de la LCAT. L'application de la LC-MS à l'étude de la LCAT permet donc une meilleure compréhension des changements lipidiques lors de l'incubation du plasma, ce qui ouvre la voie à la découverte de biomarqueurs.

**Mots-clés :** lécithine : cholestérol acyltransférase, HDL, spectrométrie de masse, LC-MS, cholestérol, lipidomique, phospholipides, MCAS.

# Abstract

The lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) is the only plasmatic enzyme capable of esterifying cholesterol molecules present in circulating plasma lipoproteins, a function critical for high-density lipoproteins (HDL) biogenesis and reverse cholesterol transport. Its activity is defined as the fractional esterification rate of free cholesterol of HDL molecules ( $FER_{HDL}$ ), which is a potential biomarker of cardiovascular risk. The cholesterol esterification reaction is initiated by the hydrolysis of a fatty acid esterified to a phosphatidylcholine molecule (PC) and its subsequent transfer on the hydroxyl group of free cholesterol, resulting in the synthesis of a cholesteryl ester (CE) and a lysophosphatidylcholine (LPC). The objective for this project was to make the proof of concept of a novel method of LCAT activity measurement by liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS), which allows simultaneous identification and quantification of each substrates and products of the LCAT reaction. With this method,  $FER_{HDL}$  was measured as with the standard enzymatic method (reference method for measurements of free cholesterol), but changes in specific lipid species was also evaluated. For example, a couple LPC were good candidates as markers of LCAT activity, as their abundance was augmented by at least 40% after incubation of plasma. LCAT activity was also measured in human plasma spiked with different concentrations of recombinant human LCAT and the 4 and 8  $\mu\text{g/mL}$  doses were enough to measure significant differences from the native plasma in 5 lipid species: LPC(16:0), LPC(18:0), PC(14:0|18:2), PC(16:0|16:1) and PC(16:0|18:0). Finally, LCAT activity analysis in human plasma samples from the Montreal Heart Institute's Biobank (50 controls and 50 cases which had a coronary atherosclerotic disease) allowed us to study the modulation of lipids in a more heterogeneous samples than pooled plasma samples. Of these lipids, PC(34:3) was lowered more following incubation of plasma in cases than in controls, making it a candidate biomarker for LCAT activity. In conclusion, application of LC-MS to the study of LCAT gave us a better understanding of lipid changes during plasma activation and opens the way to biomarker discovery.

**Keywords:** lecithin: cholesterol acyltransferase, HDL, mass spectrometry, LC-MS, cholesterol, lipidomics, CVD.

# Table des matières

|   |      |
|---|------|
| Résumé.....   | i    |
| Abstract.....   | ii   |
| Table des matières .....  | iii  |
| Liste des tableaux.....   | v    |
| Liste des figures .....   | vi   |
| Liste des abréviations .....  | viii |
| Remerciements.....  | xi   |
| 1 Introduction .....  | 1    |
| 1.1 Métabolisme des lipoprotéines .....   | 3    |
| 1.1.1 Lipoprotéines de haute densité (HDL) .....  | 4    |
| 1.1.2 Lipoprotéine de faible densité (LDL).....   | 10   |
| 1.2 La maladie athérosclérotique .....  | 12   |
| 1.2.1 Le développement de la plaque d'athérome .....  | 12   |
| 1.2.2 Le transport inverse du cholestérol.....  | 14   |
| 1.3 La lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) : description, fonction et rôle dans la maladie athérosclérotique ..... | 17   |
| 1.3.1 Historique.....   | 17   |
| 1.3.2 Structure et génétique.....   | 17   |
| 1.3.3 Déficiences en LCAT d'origine génétique .....   | 19   |
| 1.3.4 Fonction et réaction enzymatique.....   | 22   |
| 1.3.5 Mesures et calculs de l'activité LCAT .....   | 26   |
| 1.3.6 Rôle dans la maladie athérosclérotique .....  | 27   |
| 1.4 Objectifs et hypothèses .....   | 31   |
| 2 Méthodologie.....   | 33   |
| 2.1 Analyse de l'activité de la LCAT par méthode enzymatique/colorimétrique .....   | 33   |
| 2.1.1 Activation de la LCAT par incubation du plasma à 37°C .....   | 33   |
| 2.1.2 Dosage du cholestérol par kit Wako Free Cholesterol E .....   | 34   |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.2   | Analyse de l'activité de la LCAT par spectrométrie de masse .....                               | 35 |
| 2.2.1 | Extraction liquide-liquide des lipides.....   | 38 |
| 2.2.2 | Analyse par LC-MS .....   | 40 |
| 2.2.3 | Traitement des données .....  | 41 |
| 3     | Résultats.....  | 45 |
| 3.1   | Validation de la méthode d'extraction .....   | 45 |
| 3.2   | Activité de la LCAT dans le plasma déplété .....  | 46 |
| 3.2.1 | Utilisation d'isotopes stables de cholestérol pour estimer la synthèse des CE par la LCAT ..... | 53 |
| 3.2.2 | Effet de la LCAT recombinante humaine sur le plasma .....                                       | 54 |
| 3.3   | Activité LCAT dans la cohorte Biobanque ICM .....   | 62 |
| 3.3.1 | Mesures enzymatiques .....  | 63 |
| 3.3.2 | Mesures LC-MS .....   | 66 |
| 4     | Discussion.....   | 74 |
| 4.1   | Approche expérimentale .....  | 74 |
| 4.2   | Analyse du cholestérol libre.....   | 74 |
| 4.3   | Recherche de biomarqueurs candidats .....   | 76 |
| 4.3.1 | Biomarqueurs candidats dans la cohorte Biobanque ICM .....                                      | 77 |
| 5     | Conclusion.....   | 80 |
|       | Bibliographie .....   | 81 |

# Liste des tableaux

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Tableau I.    | Facteurs de risque de la maladie coronarienne athérosclérotique. ....   | 2  |
| Tableau II.   | Composition lipidique des différentes lipoprotéines. ....   | 9  |
| Tableau III.  | Programmation de la centrifuge sous vide.. ....   | 39 |
| Tableau IV.   | Tableau de recouvrement de standard représentant les grandes classes lipidiques. ....   | 46 |
| Tableau V.    | Profil biochimique du plasma groupé utilisé pour les tests d'activité de la LCAT. ....  | 47 |
| Tableau VI.   | Comparaison du dosage du cholestérol libre entre la méthode enzymatique et la méthode LC-MS.. ....                                      | 49 |
| Tableau VII.  | Espèces lipidiques modifiées en abondance par l'incubation du plasma déplété à 37°C pendant 2 heures. ....                              | 51 |
| Tableau VIII. | Données démographiques de la cohorte Biobanque ICM.....   | 62 |
| Tableau IX.   | Données biochimiques de la cohorte Biobanque ICM.....   | 63 |
| Tableau X.    | Paramètres en lien avec l'activité LCAT par mesure enzymatique dans la cohorte Biobanque ICM.. ....                                     | 64 |
| Tableau XI.   | Paramètres en lien avec l'activité LCAT dans la cohorte Biobanque ICM, séparé par sexe et par groupe (témoins et cas).....              | 65 |
| Tableau XII.  | Comparaison du $FER_{HDL}$ entre les groupes de la cohorte Biobanque ICM séparés entre la méthode enzymatique et la méthode LC-MS.....  | 66 |
| Tableau XIII. | Espèces lipidiques modifiées en abondance par l'incubation du plasma chez les groupes témoins et cas de la cohorte Biobanque ICM.. .... | 70 |

# Liste des figures

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figure 1.  | Mortalité due aux maladies cardiovasculaires chez les hommes, par 100 000 habitants et standardisées pour l'âge. ....                  | 2  |
| Figure 2.  | Classement des lipoprotéines en fonction de leur taille et leur densité. ....  | 4  |
| Figure 3.  | Progression de la dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose.....  | 13 |
| Figure 4.  | Cycle de transport inverse du cholestérol et de remodelage des HDL intégrant un rôle pour le liquide interstitiel et la lymphe. ....   | 15 |
| Figure 5.  | Structure cristalline de la LCAT.....  | 19 |
| Figure 6.  | Oeil d'une personne atteinte de FED, montrant l'opacité cornéenne.....   | 20 |
| Figure 7.  | Action enzymatique simplifiée de la LCAT .....   | 23 |
| Figure 8.  | Étapes de la réaction enzymatique de la LCAT. . ....   | 23 |
| Figure 9.  | Modèle « double ceinture avec boucle » de la conformation de l'apoA-I sur les HDL. ....  | 25 |
| Figure 10. | Équation du calcul FER de l'activité LCAT. ....  | 26 |
| Figure 11. | Équation du calcul CER de l'activité LCAT. ....  | 27 |
| Figure 12. | Diagramme de l'iFunnel QTOF6550 d'Agilent. ....  | 37 |
| Figure 13. | Diagramme de l'analyse des données du LC-MS par méthode automatisée et par méthode manuelle.....                                       | 44 |
| Figure 14. | Courbes de calibration de d7-cholestérol pour le dosage du cholestérol endogène. ....  | 48 |
| Figure 15. | Graphique de type volcano illustrant les changements d'abondance des entités ou signaux lipidiques suite à l'incubation du plasma..... | 50 |
| Figure 16. | Abondance des esters de cholestérol deutérés détectables en LC-MS après l'ajout de d7-cholestérol au plasma avant l'incubation.. ....  | 53 |
| Figure 17. | Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur le FER <sub>HDL</sub> entre la méthode de mesure enzymatique et LC-MS.....              | 56 |
| Figure 18. | Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance des LPC(16:0) et LPC(18:0). ....  | 57 |
| Figure 19. | Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance des PC(O-32:0), PC(14:0/18:2) et PC(16:0/16:1).....                         | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 20. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance du PC(16:0/18:0).....   | 59 |
| Figure 21. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance du DG(16:0/18:1).....   | 61 |
| Figure 22. Corrélation de Pearson entre les mesures de FER <sub>HDL</sub> des donneurs de la cohorte Biobanque ICM par test enzymatique et par LC-MS.....       | 67 |
| Figure 23. Abondance du cholestérol libre en fonction de la quantité d'échantillon chargé sur le LC-MS..  | 68 |
| Figure 24. Comparaison de l'abondance des PC(34:3) et PC(30:1) dans la cohorte Biobanque ICM entre les cas et témoins à 4°C et 37°C.....                        | 71 |
| Figure 25. Comparaison de l'abondance des DG(32:1), DG(O-34:1), DG(34:2) et DG(36:5) dans la cohorte Biobanque ICM entre les cas et témoins à 4°C et 37°C. .... | 73 |
| Figure 26. Synthèse du changement d'abondance des lipides du plasma déplété en lipoprotéines contenant de l'apoB suite à une incubation de 2 heures à 37°C..... | 79 |



# Liste des abréviations

ABCA1 : Cassette de liaison à l'ATP de type A1 (ATP-binding cassette A1)

ABCG1 : Cassette de liaison à l'ATP de type G1 (ATP-binding cassette G1)

ACAT : Acyl-CoA:cholestérol acyltransférase

apoA-I : Apolipoprotéine A-I

apoA-II : Apolipoprotéine A-II

apoB : Apolipoprotéine B

apoC : Apolipoprotéine C

apoE : Apolipoprotéine E

apoM : Apolipoprotéine M

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

bFGF : Facteur de croissance des fibroblastes de base (Basic fibroblast growth factor)

CABG : Pontage aorto-coronarien (Coronary artery bypass grafting)

CD36 : Grappe de différenciation 36 (Cluster of differentiation 36)

CE : Ester de cholestérol (Cholesteryl ester)

CER : Taux d'estérification du cholestérol (Cholesterol esterification rate)

CETP : Protéine de transfert des esters de cholestérol (Cholesteryl ester transfer protein)

CL : Cholestérol libre

CM : Chylomicrons

EL : Lipase endothéliale (Endothelial lipase)

FC : Amplitude/ratio de changement (Fold Change)

FDR : Taux de fausses découvertes (False discovery rate)

FER : Taux d'estérification fractionnel du cholestérol libre (Fractional esterification rate of cholesterol)

FER<sub>HDL</sub> : Taux d'estérification fractionnel du cholestérol libre sur les HDL (Fractional esterification rate of cholesterol on HDL)

HDL : Lipoprotéine de haute densité (High-density lipoprotein)

HL : Lipase hépatique (Hepatic lipase)

HPLC : Chromatographie liquide de haute performance (High-performance liquid chromatography )

ICM : Institut de Cardiologie de Montréal

ICP : Intervention coronarienne percutanée

IDL : Lipoprotéine de taille intermédiaire (Intermediate-density lipoprotein)

IM : Infarctus du myocarde

IMT : Épaisseur intima-media (Intima-media thickness)

LCAT : Lécithine:cholestérol acyltransférase

LCATrh : LCAT recombinante humaine

LC-MS : Chromatographie liquide – spectrométrie de masse (Liquid chromatography – mass spectrometry)

LDL : Lipoprotéine de faible densité (Low-density lipoprotein)

cLOESS : Régression locale cyclique (Cyclic LOcal regrESSion)

LOX-1 : Récepteur 1 des LDL oxydées de type lectine (Lectin-type oxidized LDL receptor 1)

Lp(a) : Lipoprotéine (a)

LPL : Lipase des lipoprotéines (Lipoprotein lipase)

LysoPC/LPC : Lysophosphatidylcholines

LysoPL/LPL : Lysophospholipides

MCAS : Maladie coronarienne athérosclérotique

MER : Taux d'estérification molaire du cholestérol (Molar cholesterol esterification rate)

MMP : Métalloprotéases matricielles

MTBE : Méthyl-tert-butyl-éther

MTP : Protéine microsomale de transfert des TG (Microsomal TG transfer protein)

m/z : Ratio masse sur charge (Mass-to-charge ratio)

oxLDL : LDL oxydées

PAF : Facteur d'activation plaquettaire (Platelet-activating factor)

PC : Phosphatidylcholines

PEG : Polyéthylène glycol

PL : Phospholipides

PLTP : Protéine de transfert des phospholipides (Phospholipid transfer protein)

SM : Sphingomyélines

sPLA<sub>2</sub>-II : Phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée de type II (Secreted phospholipase A<sub>2</sub> type II)

SR-BI : Récepteur éboueur de classe B type I (Scavenger receptor class B type I)

TIC : Transport inverse du cholestérol

VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire (Vascular endothelial growth factor)

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité (Very low density lipoprotein)

# Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-Claude Tardif, de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche. Cette expérience unique de travail dans un laboratoire de cette envergure aura été très formative et enrichissante. Je remercie aussi ma codirectrice, la Dre Christine Des Rosiers, pour l'accès privilégié à sa plateforme innovatrice de lipidomique ainsi que ses bons conseils et ses idées.

J'aimerai aussi remercier mon superviseur, le Dr David Rhainds, pour son encadrement, son soutien et sa grande disponibilité tout au long du projet. Ses recommandations à toutes les étapes du projet et dans la rédaction de ce mémoire ont été inestimables. Sans cette aide précieuse et ses connaissances exhaustives, ce projet n'aurait jamais eu lieu.

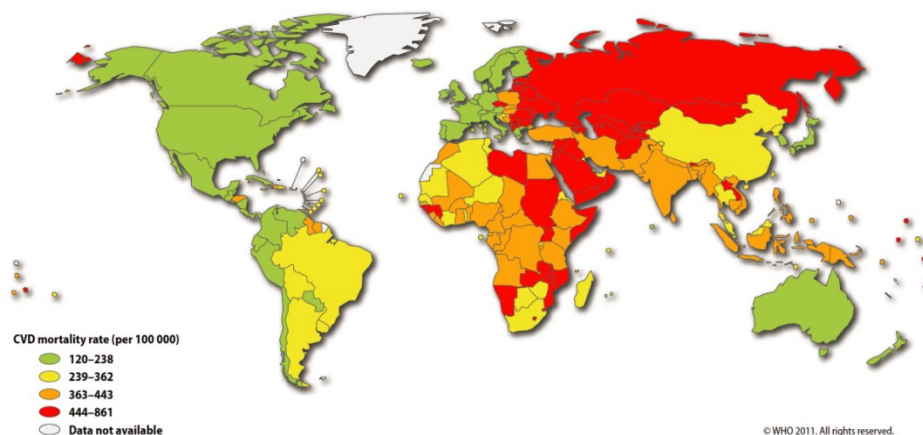
Je remercie toute l'équipe du laboratoire Tardif pour leur aide précieuse. Ils ont su répondre avec expertise à toutes les questions que j'ai pu me poser.

Finalement, mais non le moindre, je tiens à remercier spécialement Anik Forest, Isabelle Robillard Frayne, Caroline Daneault et Bertrand Bouchard de l'équipe de lipidomique du laboratoire Des Rosiers pour m'avoir fourni si généreusement de leur temps. Leur aide au niveau des manipulations et leurs compétences en lipidomique ont été essentielles à la réussite du projet. J'ai beaucoup appris sur la spectrométrie de masse grâce à eux.

# 1 Introduction

Au Canada, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause d'hospitalisation et sont responsables d'environ 20% des décès (1). De ces décès, la moitié sont dus aux maladies coronariennes athérosclérotiques (MCAS) (1). Le portrait n'est pas différent au niveau mondial : les MCAS sont la première cause de mortalité en Europe et au Royaume Uni (2, 3). Les pays de l'Europe de l'Est et Centrale sont particulièrement touchés, probablement à cause d'une forte prévalence de l'hypertension artérielle et de la consommation des produits du tabac (2, 3), la mortalité due aux MCAS chez les fumeurs étant près de 60% plus élevée que chez les non-fumeurs. La Figure 1 montre le taux de mortalité associé aux maladies cardiovasculaires par 100 000 habitants chez les hommes à travers le monde. L'incidence des MCAS est moins élevée en France, en Italie et au Japon, possiblement à cause d'une meilleure alimentation ainsi que de meilleures habitudes de vie (2, 3). En effet, l'organisation mondiale de la santé a estimé en 2002 que près de 30% des MCAS sont reliés à une faible consommation de fruits et légumes. Malgré tout, 22% des crises cardiaques en Europe de l'Ouest sont attribuables à l'hypertension artérielle. Même les pays en voie de développement, comme l'Inde ou la plupart des pays d'Afrique sont de plus en plus touchés par les maladies cardiovasculaires.

La maladie coronarienne athérosclérotique est une maladie multifactorielle causée par une accumulation de cholestérol sous la forme de plaque d'athérome au niveau des artères, ce qui réduit leur diamètre. Éventuellement, un blocage peut survenir suite à une thrombose causée par la rupture de la plaque d'athérome, causant l'angine. Cette angine peut se développer en crise cardiaque si le manque d'oxygénation du cœur persiste trop longtemps (2). La maladie athérosclérotique est un fléau moderne, causé en grande partie par notre mode de vie: le manque d'exercice physique, l'alimentation riche en gras et en sucre, la consommation de produits du tabac, mais aussi la prolongation de la durée de vie. Ces facteurs contribuent tous à augmenter l'incidence de la maladie athérosclérotique (Tableau I). Les facteurs de risques métaboliques incluent un faible taux de cholestérol HDL (HDL-C) ou un haut taux de cholestérol LDL (LDL-C), lesquels s'ajoutent à la présence de diabète.



**Figure 1. Mortalité due aux maladies cardiovasculaires chez les hommes, par 100 000 habitants et standardisées pour l'âge. Tiré de WHO 2011 (3)**

**Tableau I. Facteurs de risque de la maladie coronarienne athérosclérotique. Tiré de George SJ. (2)**

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Mode de vie</b>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consommation de produits du tabac</li> <li>• Diète calorique riche en gras saturé et en sucre et faible en fruits et légumes</li> <li>• Manque d'activité physique</li> <li>• Stress</li> <li>• Consommation excessive d'alcool</li> <li>• Obésité</li> </ul> |
| <b>Biochimiques et physiologiques</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Haut cholestérol plasmatique</li> <li>• Hypertension artérielle</li> <li>• Faible cholestérol HDL plasmatique</li> <li>• Haute concentration en triglycérides plasmatiques</li> <li>• Diabète</li> <li>• Facteurs thrombogènes</li> </ul>                     |
| <b>Personnels</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Âge</li> <li>• Sexe</li> <li>• Histoire familiale de maladies cardiovasculaires</li> <li>• Génétique</li> </ul>   |

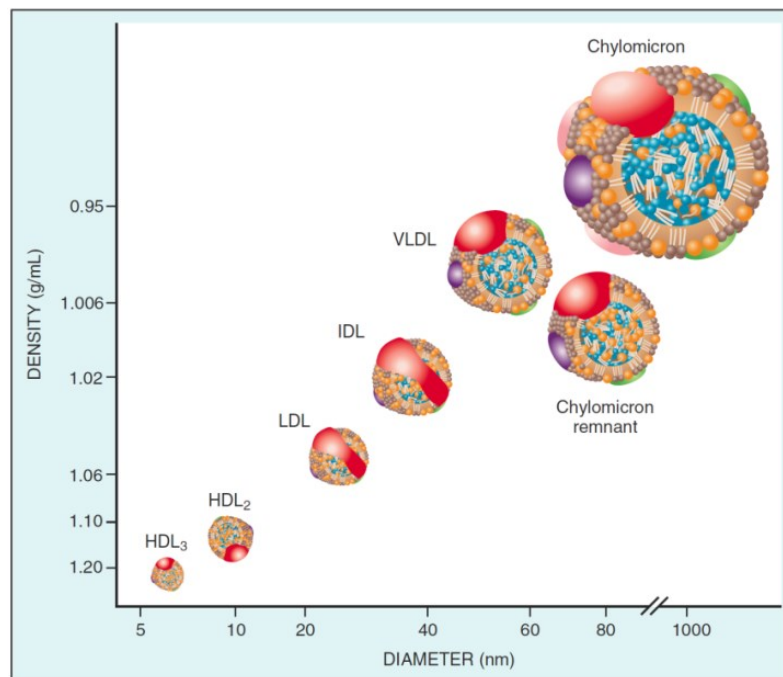
À cause de cette incidence élevée, d'importantes ressources ont été mobilisées dans le domaine de la recherche biomédicale depuis une soixantaine d'années, et notre compréhension des mécanismes sous-jacents à cette maladie s'est grandement améliorée. Ceci a d'ailleurs permis la mise au point d'un médicament très efficace pour prévenir cette maladie en 1987 : la lovastatine (archétype de la classe des statines) (4). Cependant, depuis leur mise en marché, aucun autre médicament n'a réussi à diminuer autant la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires. Il est donc important de continuer les recherches et d'approfondir nos connaissances de la maladie athérosclérotique afin de mettre au point de nouveaux médicaments.

Les statines ont montré leur efficacité dans la réduction du cholestérol LDL, ce qui a poussé les chercheurs à cibler ensuite les HDL afin de tenter d'obtenir des effets bénéfiques complémentaires à ceux des statines. Malheureusement, aucune molécule n'a réussi à obtenir un succès équivalent à celui des statines. D'ailleurs, les efforts les plus récents dans cette voie, lesquels visaient les inhibiteurs de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (dalcétrapib, torcétrapib, etc.), ont presque tous échoué à l'étape des études cliniques (5-7). Seul l'anacetrapib, mise au point par Merck, semble avoir atteint ses objectifs. Les résultats de l'étude REVEAL, une étude de phase 3 sur plus de 30 000 adultes visant à évaluer l'efficacité de l'anacetrapib pour réduire le nombre d'évènement coronariens, a montré un effet modeste de l'anacetrapib sur le risque cardiovasculaire (8).

## **1.1 Métabolisme des lipoprotéines**

Les lipoprotéines sont des complexes amphipatiques formés de différents lipides et protéines dont le rôle premier est de transporter les lipides (qui sont hydrophobes) dans le sang pour les redistribuer dans les différents compartiments du corps. Les lipoprotéines prennent généralement la forme d'entités quasi sphériques, formées d'une monocouche de phospholipides et d'au moins une apolipoprotéine. Il existe plusieurs classes de lipoprotéines, séparées selon plusieurs facteurs, comme leurs apolipoprotéines, leur densité ou leur rôle. La méthode traditionnelle de classement se base sur leur densité intrinsèque, déterminée par leur positionnement lors d'une ultracentrifugation sur un gradient de densité, et leur

diamètre, ce qui permet l'établissement de 5 grandes classes de lipoprotéines (Figure 2) (9, 10). Parmi ces lipoprotéines, 3 ont un impact direct sur la maladie athérosclérotique : ce sont les HDL, les LDL et les VLDL. Ces lipoprotéines ont chacune des compositions lipidiques différentes ainsi que des rôles différents : les HDL ont un rôle protecteur dans la maladie cardiovasculaire, alors que les LDL et les VLDL sont proathérogènes lorsque présentes en trop grande quantité, particulièrement lorsqu'elles sont oxydées (11).



**Figure 2. Classement des lipoprotéines en fonction de leur taille et leur densité.** Tiré de Braunwald's Heart Disease fig.47-4 (10)

### 1.1.1 Lipoprotéines de haute densité (HDL)

Les HDL sont de petites lipoprotéines sphériques d'un diamètre de 8-10 nm et de densité 1,063-1,21 g/mL (12). Elles contiennent une grande variété de protéines et d'apolipoprotéines ainsi que des enzymes et plusieurs types de lipides. Des différentes lipoprotéines, les HDL sont les plus hétérogènes, tant au niveau de leur structure que de leur composition, et elles jouent des rôles tout aussi variés dans l'organisme (12). Par exemple, le



rôle principal des HDL est le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où une partie de ce cholestérol est ajouté à la bile et peut être excrété hors du corps avec les selles (9). Mais les HDL jouent aussi un rôle comme molécules anti-inflammatoires, comme source de cholestérol pour la génération d'hormones stéroïdes ou comme molécule de transport pour les microARN (9).

#### **1.1.1.1 Classification des sous-classes de HDL**

Chez l'homme, les HDL sont divisées en sous-classes de taille différente. Les 4 sous-classes principales sont, en ordre croissant de densité (et décroissant de taille) : Les HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub> et préβ<sub>1</sub>-HDL (9). Cependant, les HDL peuvent aussi être divisées en différentes classes en fonction de leur contenu en apolipoprotéines, lesquels incluent les LpA-I (apoA-I), les LpA-I:A-II (apoA-I et apoA-II), les LpA-II, etc. (9). Une autre façon de procéder à la classification des HDL implique l'utilisation de gel d'électrophorèse non dénaturant à deux dimensions, ce qui permet leur séparation en fonction de leur charge (1<sup>re</sup> dimension) et de leur taille (2<sup>e</sup> dimension). Cette séparation permet l'établissement de trois classes : les α-HDL, préβ-HDL et γ-HDL (9). Dans ce mémoire, les notations HDL<sub>1-3</sub> et préβ-HDL seront utilisées car ce sont généralement les plus utilisées.

#### **1.1.1.2 Apolipoprotéines des HDL**

Les HDL peuvent contenir plusieurs apolipoprotéines qui interagissent avec divers récepteurs et enzymes du sang et des tissus (9). De ces protéines, l'apoA-I est la plus abondante, représentant environ 70% du contenu en protéine des HDL (9). Cette protéine est sécrétée par les hépatocytes et l'intestin (9) sous une forme faiblement enrichie en lipides. Ces apoA-I sont ensuite enrichies en lipides au niveau du foie, mais aussi des tissus périphériques (comme au niveau de la plaque), et deviendront les premières préβ-HDL. La seconde apolipoprotéine la plus abondante est l'apoA-II. Bien qu'elle ne représente que 20% de la masse en protéines des HDL, 75% des HDL sont LpA-I:A-II (9), et ces HDL sont plus résistantes au remodelage et plus stables dans le sang (13). Les autres apolipoprotéines, moins abondantes, incluent les apoC-I, C-II et C-III, l'apoM, l'apoD et l'apoE. Les apoC régulent le catabolisme des triglycérides, alors que l'apoE favorise l'assimilation des HDL complètes par le

foie, mais est aussi la principale apolipoprotéine du système nerveux (9). Les apolipoprotéines A, C et E peuvent toutes provoquer l'efflux de cholestérol hors des cellules via le transporteur ABCA1, mais l'apoA-I est la molécule la plus importante à cet égard à cause de sa forte abondance (9). Finalement, L'apoA-I est l'activateur principal de la LCAT dans le plasma, mais on considère aussi les apoC-I et apoE comme des activateurs (14).

### **1.1.1.3 Métabolisme des HDL**

La première étape de la formation des HDL passe par l'ajout de lipides à l'apoA-I par le transporteur membranaire ABCA1. La liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 permet de modifier la conformation des domaines transmembranaires de la protéine. Ce changement de conformation permet le passage de PL (préférentiellement des PC) et de cholestérol du côté cytoplasmique au côté externe de la membrane cellulaire (9). L'accumulation de PC et de cholestérol provoque une déstabilisation de la membrane, ce qui permet l'extrusion de la forme naissante des HDL, les pré $\beta$ 1-HDL, des particules de petite taille (diamètre de 6,5 nm) adoptant une forme discoïdale (9). Les pré $\beta$ 1-HDL sont de très bons accepteurs de cholestérol, elles ont donc un rôle important à jouer dans l'efflux de cholestérol à partir des tissus périphériques et des macrophages résidents de la plaque d'athérome (15). L'accumulation de cholestérol dans les pré $\beta$ -HDL est toutefois limitée par la taille réduite de ces lipoprotéines. Afin d'être capables de recevoir plus de cholestérol et éventuellement des triglycérides, les pré $\beta$ -HDL seront modifiées par l'action de deux enzymes : la LCAT et la protéine de transfert des phospholipides (PLTP). La LCAT estérifie le cholestérol présent à la surface des HDL, et comme les esters de cholestérol sont moins polaires que le cholestérol libre, ils vont migrer vers le centre de la lipoprotéine, ce qui permet l'établissement d'un gradient de cholestérol libre vers la l'enveloppe de la HDL, mais aussi l'augmentation en taille de celle-ci (9, 15, 16). Pour compenser cette augmentation de la taille et du rapport surface/volume, la PLTP transfère les phospholipides des VLDL et des LDL vers les HDL (9, 15). Sous l'effet de ces deux enzymes plasmatiques, la pré $\beta$ 1-HDL deviendra une HDL<sub>3</sub>, de forme sphérique. La HDL<sub>3</sub> est aussi un bon accepteur de cholestérol et contribuera davantage à l'efflux de cholestérol par son interaction avec des transporteurs tels qu'ABCA1 ou ABCG1 (9). La maturation des HDL<sub>3</sub> en

HDL<sub>2</sub> implique l'action de la LCAT, qui en estérifiant le cholestérol empêche son reflux vers les cellules en maintenant un gradient vers les HDL. La CETP est un transporteur plasmatique qui permet l'échange de CE contre des TG entre les HDL et les LDL/VLDL, ce qui remodèle les HDL en particules plus petites. Sous son action, près de deux tiers des CE des HDL générés par la LCAT seront transférés sur des lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B (apoB) avant d'arriver au foie (9, 16).

Une fois sous la forme de HDL<sub>3</sub> et de HDL<sub>2</sub>, les HDL retournent généralement vers le foie, ou elles se lient au récepteur éboueur de classe B type I (SR-BI) des hépatocytes par interaction avec leurs apolipoprotéines, ce qui permet l'élimination de leur contenu en ester de cholestérol par captation sélective par le SR-BI, sans internalisation de la HDL. Les CE (mais aussi les TG, des PL et autres molécules) sont transférés des HDL à la membrane cellulaire des hépatocytes puis internalisés par une voie non endosomale. Les CE seront ensuite hydrolysés par une estérase et le cholestérol est généralement éliminé dans la bile (15, 16). En plus de la voie SR-BI, les HDL et leur contenu peuvent aussi être internalisés dans les hépatocytes par deux voies distinctes. La première est dépendante de la clathrine et implique la liaison de l'apoA-I à un récepteur appelé ecto-F1-ATPase, ce qui induit l'hydrolyse d'ATP en ADP qui active le récepteur P2Y<sub>13</sub> (17). La deuxième voie implique le récepteur CD36, qui possède une forte homologie avec SR-BI (18). Toutefois, en condition physiologique normale, ces deux voies d'internalisation ne contribuent pas beaucoup au transport des CE vers le foie (17).

Ce transport de cholestérol des tissus périphériques vers le foie forme la base d'un système appelé le transport inverse du cholestérol (TIC) (9, 15). Le TIC est responsable de l'élimination du cholestérol excédentaire des cellules, et est particulièrement important dans le contrôle et l'élimination des plaques d'athéromes, responsable de la MCAS. Cependant, les HDL ne font pas qu'acheminer le cholestérol vers le foie. Elles sont aussi responsables d'acheminer celui-ci vers les glandes surrénales, où le cholestérol peut être converti en hormones stéroïdiennes. De plus, outre le SR-BI, d'autres enzymes, comme la lipase hépatique (HL) ou la lipase endothéliale (EL) sont aussi impliquées dans le remodelage des HDL. Sous l'action de ces enzymes, les HDL<sub>2</sub> et les HDL<sub>3</sub> peuvent être modifiées pour devenir plus petites,

ce qui accélère leur catabolisme et permet de libérer les molécules d'apoA-I, qui peuvent alors recommencer un nouveau cycle de TIC (15).

#### **1.1.1.4 Composition lipidique des HDL**

Afin de faciliter la lecture, la notation utilisée dans ce mémoire pour décrire les lipides est celle suggérée par le consortium LIPIDS MAPS ([lipidmaps.org](http://lipidmaps.org)). Selon cette notation, une phosphatidylcholine formée d'un palmitate et d'un linoléate serait indiquée comme PC(16:0/18:2) où PC représente le groupement polaire choline, 16:0 l'acide gras palmitate (16 carbones) en position sn-1 et 18:2 le linoléate (18 carbones et 2 insaturations) en position sn-2 du glycérol. Si les chaînes spécifiques d'acides gras étaient inconnues, la notation serait PC(34:2).

Les HDL sont des molécules très hétérogènes, et leur composition lipidique dépend de plusieurs facteurs tels leur densité et l'état de santé du donneur. Les méthodes lipidomiques modernes ont toutefois grandement simplifié l'analyse de la composition des lipoprotéines, ce qui permet de faire des analyses représentatives à grande échelle. Chez des individus sains, les HDL sont composés principalement de PC, qui constituent jusqu'à 40% de leur masse en lipides et plus de 80% de la masse de tous les PL, et de CE, qui représentent eux aussi environ 24 à 45% de la masse totale en lipides de la particule HDL (Tableau II) (12, 19). Viennent ensuite le cholestérol libre (10 à 25% selon les sources) et les triglycérides (5 à 12%) et finalement les LPC (1 à 8%) et les sphingomyélines (SM) (4,5 à 6%) (12, 19). Les HDL possèdent beaucoup de LPC comparativement aux autres lipoprotéines, principalement à cause de l'action de la LCAT. Les autres lipides sont présents en quantité beaucoup moindre, mais peuvent toutefois avoir des effets sur la HDL. Par exemple, les phospholipides à charge négative peuvent avoir une influence importante sur la charge nette de la HDL, ce qui pourrait moduler les interactions entre les HDL et autres molécules plasmatiques (12).

**Tableau II. Composition lipidique des différentes lipoprotéines.** Les VLDL sont formées principalement de lipides, dont les triglycérides en représentent plus de 50% de la masse, tandis que les LDL contiennent la plus grande proportion d'ester de cholestérol et de cholestérol libre de ces lipoprotéines. Les HDL ne doivent que 50% de leur masse aux lipides et sont formés principalement de phospholipides et d'ester de cholestérol. Tiré de Francis GA. (9)

|  | VLDL       | LDL         | HDL         |
|--|------------|-------------|-------------|
| Densité (g/mL)                                 | 0.94-1.006 | 1.006-1.063 | 1.063-1.210 |
| Lipides totaux<br>(% masse)                    | 90-92      | 75-80       | 40-48       |
| Glycérolipides<br>(% masse des lipides)        | 50-58      | 7-11        | 6-7         |
| Esters de cholestérol<br>(% masse des lipides) | 15-23      | 47-51       | 24-45       |
| Cholestérol libre<br>(% masse des lipides)     | 4-9        | 10-12       | 6-8         |
| Phospholipides<br>(% masse des lipides)        | 19-21      | 28-30       | 42-51       |
| PC (% masse des PL)                            | 60-74      | 64-69       | 70-81       |
| SM (% masse des PL)                            | 15-23      | 25-26       | 12-14       |
| LPC (% masse des PL)                           | ~5         | 3-4         | ~3          |
| Autres<br>(% masse des PL)                     | 6-10       | 2-10        | 5-10        |

Parmi les PC, les 4 espèces les plus abondantes sur les HDL sont les PC(34:2) (31%), PC(36:2) (15%), PC(36:4) (13%) et PC(34:1) (12%) (19). L'analyse des LPC les plus abondantes peut nous renseigner sur la nature des acides gras composant ces PC. Les LPC les plus abondantes sont les LPC(16:0) (26%), LPC(18:2) (24%), LPC(18:1) (18%) et LPC(18:0) (18%) (19). Comme la position sn-1 des PC est généralement occupée par un acide gras saturé, il est probable que la PC la plus abondante (PC(34:2)) soit formée des deux LPC les plus abondantes. Cette PC est donc probablement une PC(16:0/18:2). Finalement, les CE les plus abondants sont les CE(18:1), CE(18:2), CE(16:0) et CE(20:4), en accordance avec les PC les plus abondantes (19).

### **1.1.2 Lipoprotéine de faible densité (LDL)**

Les LDL, comme les HDL, sont formées d'une monocouche de phospholipides, avec une apolipoprotéine et un cœur de lipides neutres. Cependant, les LDL font partie d'une famille de lipoprotéines (LDL, IDL, VLDL et CM) qui ont une seule molécule d'apoB comme apolipoprotéine principale, et qui ont pour fonction primaire le transport des triglycérides ou, pour les LDL, des esters de cholestérol (20).

Contrairement aux HDL, les LDL ne sont pas fabriquées par les cellules, elles sont plutôt formées par le remodelage des VLDL. Ces VLDL sont formées dans le foie à mesure que l'apoB est produite (20, 21). La sécrétion de l'apoB implique la formation d'une lipoprotéine riche en TG par l'action de la protéine microsomale de transfert des TG (MTP), une protéine capable de transférer les lipides neutres entre les vésicules de la cellule hépatique (20). De plus, il ne peut y avoir qu'une seule apoB par lipoprotéine. Une fois sécrétées, les VLDL sont remodelées en IDL puis en LDL par plusieurs mécanismes : l'hydrolyse des TG et des PL par des lipases, particulièrement la lipase des triglycérides (LPL) et la lipase hépatique (HL); le transfert de différents lipides entre les lipoprotéines par l'action de protéines de transfert (CETP, PLTP) ou l'efflux de lipides par les cellules (21). De plus, contrairement aux apolipoprotéines des HDL, les apoB ne se transfèrent pas entre les lipoprotéines. Finalement, lorsque les LDL sont internalisées par l'interaction avec les récepteurs de la famille du rLDL, il y a endocytose de l'apoB par la même occasion (20).

Contrairement aux HDL, les LDL sont pathogènes dans la maladie cardiovasculaire athérosclérotique, entre autres car elles s'accumulent dans le plasma lorsque les voies reliées à son catabolisme sont perturbées ou lorsque la production de VLDL s'accélère suite à une augmentation de la concentration en TG du foie, comme dans le cas de l'hypertriglycémie familiale (21). Quand le nombre de VLDL devient trop important, les CE contenues dans les LDL sont échangés pour des TG par la CETP. Cet échange provoque la formation de petites LDL denses pauvres en CE, mais riches en TG, qui sont particulièrement athérogènes (21). Lorsque ces petites LDL sont présentes en trop grande quantité, elles peuvent s'accumuler derrière la barrière endothéliale et s'oxyder (21). Ces LDL oxydées (oxLDL) sont liées et internalisées en vrac par les macrophages, qui deviennent alors des cellules spumeuses, chargées de gouttelettes lipidiques riches en cholestérol et en triglycérides, qui contribuent à l'accroissement du volume de la plaque d'athérome.

Les LDL sont aussi parfois porteuses d'une autre apolipoprotéine, la Lp(a), qui est un facteur de risque indépendant du taux de LDL dans le développement de la maladie cardiovasculaire athérosclérotique (21, 22). La Lp(a) est une molécule liée à l'apoB et formée de plusieurs domaines appelés « domaine kringle ». Chaque Lp(a) est formée de 10 kringle IV (type 1-10) ainsi que d'un kringle V et d'un domaine similaire à une protéase (23). La Lp(a) est hautement hétérogène car le domaine kringle IV de type 2 est formé d'un nombre variable de répétitions (2-30) (23). La Lp(a) est particulièrement athérogène lorsque présente en trop grande concentration ou lorsqu'elle est présente comme isoforme courte, comportant seulement quelques répétitions du kringle IV type 2, car les isoformes courtes sont produites plus rapidement par le foie (24). La forte homologie du domaine kringle V avec le plasminogène limite, par compétition avec les sites de liaison au plasminogène, la conversion du plasminogène en plasmine, ce qui augmente les risques de thrombose (21, 23). Une des particularités de la Lp(a) est que sa concentration ainsi que la quantité de répétitions du domaine kringle IV type 2 sont génétiquement déterminés, certaines populations (comme les Afro-Américains) ont donc naturellement plus de Lp(a), ce qui augmente ce facteur de risque cardiovasculaire indépendamment de leurs habitudes de vie (25).

## **1.2 La maladie athérosclérotique**

La maladie athérosclérotique est une atteinte progressive des vaisseaux sanguins, définie comme une inflammation locale de la surface endothéliale en réponse à plusieurs dommages, accompagnée d'une prolifération des fibroblastes (2). Tel que mentionné dans l'introduction, la maladie coronaire athérosclérotique est multifactorielle, et plusieurs facteurs de risques, modifiables ou non, ont été établis au cours des années. Ces facteurs de risque vont du mode de vie au profil biochimique, et dans une certaine mesure, la plupart de ces facteurs sont interdépendants (Tableau I) (2). Ainsi, un fumeur depuis 40 ans aura habituellement aussi une pression sanguine plus élevée, la cigarette ayant une influence sur celle-ci. Malgré tout, certains facteurs de risques ont plus de poids que d'autres.

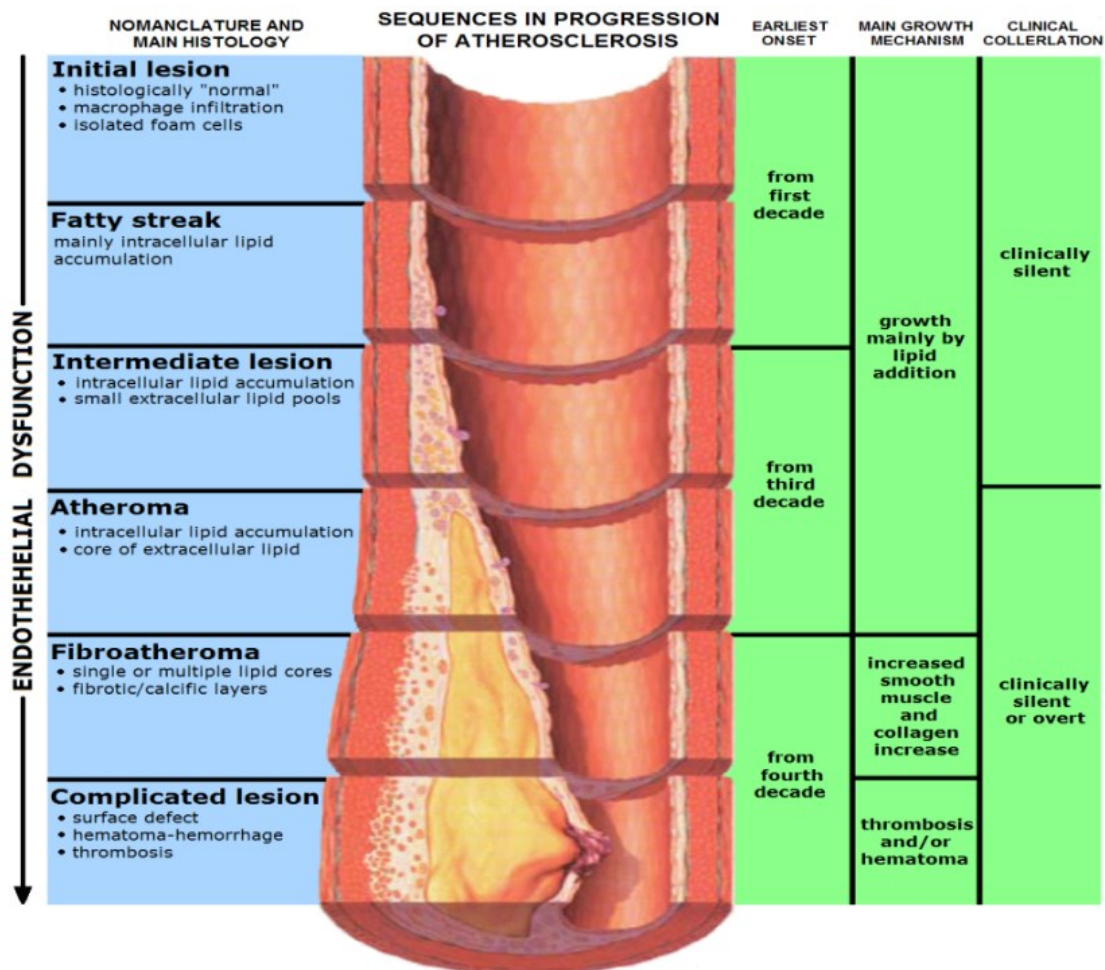
### **1.2.1 Le développement de la plaque d'athérome**

Les vaisseaux sanguins artériels sont composés de trois couches : l'intima, formée de cellules endothéliales, et la média, composée de cellules musculaires lisses et l'adventice, composée principalement de collagène et supportée par la lamina (2). Les premières lésions athérosclérotiques sont caractérisées par une accumulation de macrophages spumeux sous l'intima. Ces lésions sont appelées des stries lipidiques et sont déjà visibles chez le jeune adulte (Figure 3). Elles se retrouvent généralement au niveau de l'aorte, où le flux de sang important augmente les risques de blessures de la surface endothéliale, ainsi qu'au niveau des coronaires qui irriguent le cœur (26). En effet, les dynamiques du flux sanguin ne sont pas égales partout, et certains sites sont plus à risque de dommages. Ces sites ont souvent une forme qui vient perturber le flux sanguin, ce qui cause un stress de cisaillement sur les cellules endothéliales, qui deviennent plus perméables et plus à risque d'inflammation et d'accumulation de macrophages spumeux (26).

Les stries lipidiques ne représentent pas un risque en soi, mais elles sont des précurseurs de la plaque athérosclérotique, formée d'une accumulation de macrophages spumeux, de lipides extracellulaires apportés par les LDL et autres lipoprotéines et de cellules musculaires lisses dont le phénotype s'apparente à un macrophage (26). Au cours de la



progression de la plaque, les cellules qui la composent subissent une forte inflammation et finissent par former un cœur nécrosant, tandis qu'une chape fibreuse se forme entre la plaque et la lumière du vaisseau sanguin (26).



**Figure 3. Progression de la dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose.**

Tiré de Wikipédia (27), image utilisée sous CC BY-SA 3.0

À un stade avancé, si la plaque ne s'est pas stabilisée (par la formation d'une chape fibreuse épaisse), la conséquence finale est sa rupture probable. La rupture de la plaque déclenche une thrombose ou le détachement d'un fragment (embolie) (26). Dans les deux cas, l'obstruction d'un vaisseau sanguin peut avoir des conséquences désastreuses comme un infarctus du myocarde, une embolie pulmonaire ou un accident vasculaire cérébral. Plusieurs facteurs peuvent affecter la stabilité de la plaque et favoriser sa rupture, mais les trois plus

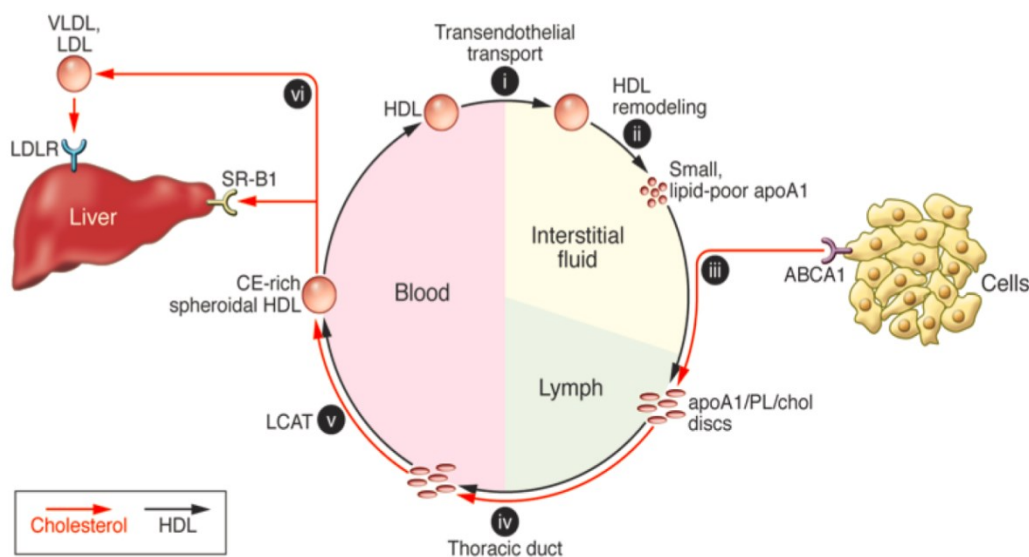
importants sont l'amincissement de la chape fibreuse, la dégradation de la matrice ainsi que la formation et la thrombose de microvaisseaux dans la plaque (2, 26, 28). L'amincissement de la chape fibreuse est causé par l'apoptose des cellules musculaires qui la composent, l'augmentation de la taille du cœur nécrotique ou encore l'inflammation de celle-ci, qui augmente l'activité de protéases responsables de sa dégradation (2, 26). La dégradation de la matrice implique la diminution de la quantité de collagène dans la plaque, ce qui réduit sa résistance. Cette dégradation s'effectue par l'action de diverses protéases (cathepsines, métalloprotéases matricielles (MMP), plasmine, etc.) sécrétées par les macrophages et autres cellules immunitaires (2, 28). La néo angiogenèse au site de la plaque est plus forte lorsque la plaque est instable. Les mastocytes présents au niveau de la plaque sont capables de relâcher plusieurs cytokines proangiogéniques (histamine, héparine, VEGF, bFGF, etc.) qui contribuent à la formation de vaisseaux sanguins incompetents. Ces vaisseaux sanguins se dégradent rapidement dans l'environnement hostile de la plaque, libérant globules rouges et autres sources de lipides. Ce cycle de néo angiogenèse et d'inflammation représente un stimulus proathérogénique fort (2, 28).

À la lumière des conséquences d'une rupture de la plaque d'athérome, il est important de pouvoir contrôler le développement de la plaque, par exemple en modifiant le profil lipidique des patients. À l'inverse des LDL qui jouent un rôle néfaste au niveau de la plaque, les HDL, particulièrement sous leur forme faiblement enrichie en lipides, sont protectrices. Les HDL sont aussi anti-inflammatoires et peuvent renverser l'oxydation des LDL, ce qui peut ralentir la progression de la plaque. De plus, comme mentionné à la section métabolisme des lipoprotéines, les HDL sont responsables du transport inverse du cholestérol, un mécanisme considéré comme important pour la stabilisation et même la diminution de la charge athérosclérotique (29). Toutes ces fonctions font de la particule HDL une cible privilégiée pour le contrôle de la maladie athérosclérotique.

### **1.2.2 Le transport inverse du cholestérol**

Le transport inverse du cholestérol est le nom donné à un ensemble de réactions ayant pour but de transporter le cholestérol présent au niveau des tissus périphériques vers le foie

(Figure 4). Ce transport est très important chez l'homme, car la plupart des cellules ne sont pas capables de cataboliser leur cholestérol et elles doivent donc l'éliminer par d'autres voies (30). La première étape du TIC s'effectue au niveau des tissus périphériques, où les cellules chargées en cholestérol libre vont transférer celui-ci vers un accepteur présent dans le plasma ou la lymphe, la HDL. La plupart des types cellulaires sont capables de transférer du cholestérol aux HDL, mais dans le contexte de la plaque athérosclérotique, ce sont principalement les macrophages (souvent sous forme de cellules spumeuses) qui sont impliqués (30). Ce transfert est appelé efflux de cholestérol, et les macrophages peuvent effectuer de l'efflux par 4 voies : 1- par diffusion passive, 2- par le transporteur SR-B1, 3- par le transporteur ABCG1 et 4- par le transporteur ABCA1(30). Cette dernière voie est particulière, puisque le transporteur ABCA1 est responsable de transférer des PL et du cholestérol à l'apoA-I pauvre en lipides, et joue donc un rôle clé dans la biogenèse des HDL (30).



**Figure 4. Cycle de transport inverse du cholestérol et de remodelage des HDL intégrant un rôle pour le liquide interstitiel et la lymphe.** Tiré de Randolph GJ. 2014 (15)

Le détail de toutes les étapes du TIC n'est pas connu avec précision, mais la première étape implique la liaison d'une molécule d'apoA-I pauvre en lipides au transporteur ABCA1 des

macrophages présents dans la plaque, ce qui permet le transfert du cholestérol libre et des phospholipides de la membrane plasmique des macrophages vers l'apoA-I, qui forme alors une pré $\beta$ 1-HDL discoïdale (15, 31). L'on ne sait pas exactement comment cette molécule d'apoA-I pauvre en lipide se retrouve au niveau de la plaque, mais elle pourrait provenir du catabolisme des HDL par des lipases comme la EL et la HL ou par l'action de protéines de transfert comme la PLTP et la CETP dans la paroi vasculaire. L'apoA-I pourrait aussi provenir de lipoprotéines présentes au niveau de la lymphe, où la PLTP est particulièrement active (15). Ces pré $\beta$ 1-HDL chargées en cholestérol sont ensuite évacuées de la plaque par le système lymphatique et déversées dans la circulation sanguine (15). Les pré $\beta$ 1-HDL sont le substrat préféré d'une unique enzyme dans le sang, la LCAT, qui estérifie le cholestérol libre des HDL à l'aide des acides gras des phospholipides formant la lipoprotéine (32). Une fois estérifié, le cholestérol migre vers le centre de la lipoprotéine, ce qui permet sa maturation en HDL<sub>3</sub> puis éventuellement en HDL<sub>2</sub>. Les HDL<sub>3</sub> continuent de faire de l'efflux, mais cet efflux passe plutôt par les 3 autres voies restantes : le transport passif, par exemple des globules rouges vers les HDL, ainsi que par l'action des transporteurs SR-BI et ABCG1 (9).

Au cours de leur maturation, les HDL vont aussi acquérir des triglycérides par l'action de la CETP (9). L'action de la CETP met en évidence le fait que les LDL ont aussi un rôle important à jouer dans le TIC, et une étude avec traceurs radioactifs a montré que les CE des HDL qui se rendent au foie passent presque tous par une lipoprotéine contenant de l'apoB (33, 34). Toutefois, le cholestérol des HDL peut aussi être transféré directement au foie ou aux glandes surrénales par l'action du transporteur SR-BI. Dans le foie, les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre qui est alors excrété dans la bile et déversé dans l'intestin, pour être éventuellement éliminé dans les selles (33). Contrairement aux LDL, les HDL ne sont généralement pas complètement internalisées par le foie. Elles restent donc dans la circulation où elles peuvent continuer de faire de l'efflux de cholestérol, ou alors, elles sont remodelées par les lipases mentionnées ci-dessus, ce qui permet de libérer à nouveau de l'apoA-I délipidée et de recommencer un cycle complet de TIC (15, 31).

## **1.3 La lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) : description, fonction et rôle dans la maladie athérosclérotique**

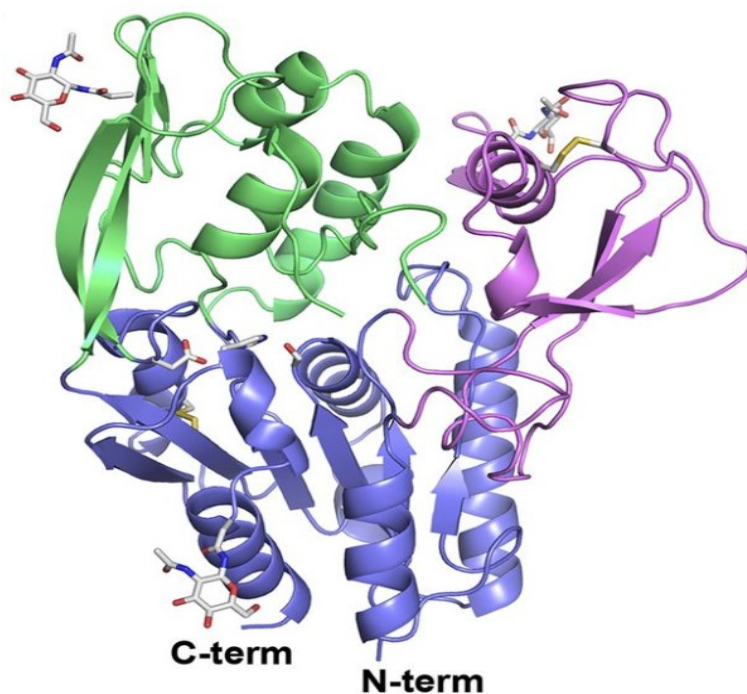
### **1.3.1 Historique**

Les premiers signes de la présence d'estérification du cholestérol libre dans le plasma ont été découverts en 1935 (35), mais il faudra attendre 1962 pour que Glomset identifie formellement la LCAT, enzyme responsable de la totalité de l'estérification du cholestérol libre au niveau du plasma (14). Par la suite, la première famille porteuse d'une déficience complète en LCAT fût découverte en 1967 (36). L'intérêt de la communauté scientifique pour la LCAT connut des hauts et des bas pendant 2 décennies avant une résurgence d'intérêt à dans les années 90. Entre autres, la mise au point d'une méthode radioactive de mesure de l'activité endogène de LCAT par Milada Dobiasova (37) a permis de simplifier les tests sur l'enzyme. Plus récemment, les travaux simultanés des équipes de Jere Segrest et Derek Piper ont permis la mise au point d'un modèle moléculaire de la LCAT (38) suivi de quelques mois plus tard par une cristallisation à haute résolution de la protéine (39). Finalement, les premiers essais cliniques utilisant de la LCAT recombinante humaine pour le traitement de l'athérosclérose et des déficiences génétiques en LCAT sont en cours (40, 41).

### **1.3.2 Structure et génétique**

Le gène *LCAT* est localisé sur le chromosome 16q22, et a une longueur de 4,5 kb pour 1,5 kb de séquence codante (42). L'on retrouve l'ARN messager de la LCAT principalement au niveau du foie, mais aussi en faible quantité niveau du cerveau et très faiblement au niveau du cœur et des gonades (43). Le gène *LCAT* encode une protéine sécrétée de 416 aa, d'un poids moléculaire apparent de 55 kDa, mais 4 sites de *N*-glycosylation (Asn<sub>20</sub>, Asn<sub>84</sub>, Asn<sub>272</sub> et Asn<sub>384</sub>) importants pour l'activité de la protéine augmentent sa masse à environ 68 kDa (44, 45). Comme la LCAT a été cristallisée il a quelques années par Derek Piper et son équipe (39), l'on possède beaucoup d'information sur sa structure, présentée à la Figure 5.

La protéine possède deux ponts disulfures (Cys<sub>50</sub>-Cys<sub>74</sub> et Cys<sub>313</sub>-Cys<sub>356</sub>) (39) et adopte une conformation d'hydrolase de type  $\alpha/\beta$ . Cependant, la LCAT ne possède que 6 des 8 feuillets  $\beta$  normalement associés à ce genre de structure, le premier feuillet correspondant au feuillet numéro 3 de la numérotation classique (39). Le site actif de l'enzyme est contenu dans le cœur de l'hydrolase et prend la forme d'une triade catalytique classique des hydrolases, formées par les acides aminés Ser<sub>181</sub>, Asp<sub>345</sub> et His<sub>377</sub>. Un trou oxyanion, servant à retenir l'acyle-enzyme formé par la réaction d'hydrolyse, est créé par le duo d'acides aminés Cys<sub>31</sub> et Leu<sub>182</sub> (39). En plus de son domaine principal d'hydrolase, la LCAT possède deux sous-domaines : le premier, aux résidus 32-119, est formé principalement d'acides aminés sans structure secondaire, et est marqué par la présence de la première liaison disulfure (Cys<sub>50</sub>-Cys<sub>74</sub>). Ce sous-domaine serait responsable d'établir l'interface eau-lipide nécessaire à l'activité de l'enzyme sur les lipoprotéines (39). Le second sous-domaine possède deux insertions dans la portion hydrolase, et est formé des résidus 214-303 et 319-344. Ce sous-domaine formé de 4 feuillets  $\beta$  et 3 hélices  $\alpha$  forme un couvercle sur le site catalytique, protégeant le site catalytique lorsque la protéine se retrouve en milieux aqueux (39).



**Figure 5. Structure cristalline de la LCAT.** Légende: Domaine hydrolase en bleu, sous-domaine 1 en violet et sous-domaine 2 en vert. Adapté de Piper DE et al. 2015(39)

### 1.3.3 Déficiences en LCAT d'origine génétique

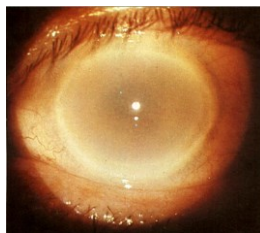
Il existe actuellement deux maladies génétiques caractérisées par une altération de l'activité de la LCAT. La première est une déficience partielle de l'activité LCAT, appelée *Fish-Eye Disease* (FED) (46). La seconde, découverte avant la FED, est plus sévère et est caractérisée déficience complète de la LCAT. Elle est appelée *familial LCAT deficiency* (FLD) ou déficience familiale en LCAT (47). Ces deux maladies sont considérées avoir un mode de transmission autosomique récessif, mais une étude récente sur le phénotype présenté par des hétérozygotes italiens a démontré que ceux-ci avaient certains signes de la maladie, comme un HDL-C plus bas et une LCAT moins active et en plus faible concentration plasmatique (48, 49). Ces informations indiquent que les déficiences en LCAT pourraient avoir un mode de transmission co-dominant.

#### 1.3.3.1 Fish-eye disease (FED)

La première occurrence de familles atteintes de FED a été rapportée en 1982 par Lars Carlson, à l'institut Karolinska de Stockholm (46). Dans son rapport, Carlson présente deux cas de familles suédoises dont certains des membres étaient atteints d'une maladie causant une opacification de la cornée. Puisque les yeux des patients atteints rappelaient les yeux des poissons bouillis (Figure 6), la première famille étudiée par Carlson était appelée « famille avec la maladie des yeux de poisson » dans leur village natal (46). Carlson a effectué plusieurs tests afin d'élucider la cause de cette maladie, mais sans succès. Il a toutefois souligné la ressemblance entre le phénotype présenté par ses patients et celui présenté par les patients atteints de la maladie de Tangier (qui est caractérisée par une déficience dans le transporteur ABCA1) et de la FLD. Les patients étaient caractérisés par une quantité légèrement diminuée d'esters de cholestérol dans le sérum, une réduction de 90% du HDL-C et un enrichissement des LDL en triglycérides. Les HDL des patients étaient plus petites que les HDL<sub>3</sub> normales, mais

puisque ses patients semblaient avoir une activité LCAT normale et que le ratio CE/CL des HDL des patients était normal (bien que la concentration en CE des HDL était très faible), il a éliminé, par erreur, la possibilité d'une déficience en LCAT (46). Il faudra attendre 1985 pour qu'il identifie avec succès la cause de cette maladie : une déficience de l'activité  $\alpha$ -LCAT (activité sur les HDL) (50).

La FED est donc causée par une incapacité de la LCAT à estérifier le cholestérol sur les HDL, mais son activité sur les LDL n'est pas affectée. En plus de présenter les opacités cornéennes typiques de la déficience en LCAT (causé par une accumulation de PC et de CL et une diminution des CE au niveau de la cornée), la FED est caractérisée par une augmentation des TG plasmatiques, une très forte diminution du HDL-C, mais une concentration plasmatique en cholestérol total égale ou un peu plus faible que normale, la concentration en ester de cholestérol dans les LDL étant plus importante en compensation (51, 52). La LCAT est habituellement légèrement moins abondante que chez les sujets sains, mais son activité d'estérification n'est pas affectée. Généralement, les seules HDL présentent dans le plasma des patients atteints de FED sont des pré $\beta$ -HDL. Étonnamment, les porteurs ne semblent pas présenter une plus forte propension aux maladies cardiovasculaires que les sujets sains, possiblement parce les HDL sont surtout présentes sous la forme de pré $\beta$ 1-HDL, lesquelles effectuent aussi de façon efficace l'efflux de cholestérol, et que le catabolisme des lipoprotéines contenant de l'apoA-I est ralenti, ce qui pourrait conférer des effets protecteurs (51). Généralement, les mutations de la LCAT causant la FED sont localisées sur la portion hydrophile de l'enzyme, ce qui peut affecter la liaison aux petites molécules HDL ainsi que l'activation par l'apoA-I (39, 51, 53).



**Figure 6. Oeil d'une personne atteinte de FED, montrant l'opacité cornéenne.**

Tiré de Carlson LA. 1982 (46)



### 1.3.3.2 Familial LCAT deficiency (FLD)

La première description d'une famille atteinte d'une déficience totale en activité LCAT est venue seulement quelques années après l'identification formelle de la protéine par Glomset(14). En 1967, Norum et Gjone, de l'hôpital universitaire Rikshospitalet d'Oslo, ont rapporté l'absence presque totale d'esters de cholestérol et de HDL dans le sérum de 3 sœurs d'une famille norvégienne (47). Les sœurs présentaient une anémie, une protéinurie ainsi qu'une opacité cornéenne. La concentration plasmatique en cholestérol libre, en triglycérides ainsi qu'en phospholipides était plus élevée que la normale, et le sérum ne présentait aucune activité LCAT mesurable (47).

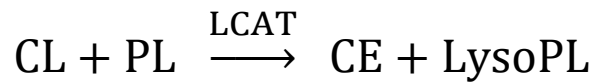
De façon générale, les homozygotes FLD présentent plusieurs phénotypes : premièrement, les symptômes les plus apparents sont les opacités cornéennes, dont la sévérité varie en fonction de la personne (51). Deuxièmement, les porteurs ont une anémie normochrome et normocytaire, mais leurs globules rouges prennent la forme d'une cloche ou d'un chapeau mexicain. Cette déformation est causée par une augmentation de la quantité de cholestérol libre de la membrane cellulaire, ce qui la fragilise et cause une hémolyse modérée et une diminution de l'érythropoïèse (51, 54). Finalement, la cause principale de mortalité de la FLD est la maladie rénale. En effet, une protéinurie peut être détectée très tôt chez ces patients et vers la cinquantaine, cette protéinurie se développe en insuffisance rénale. La cause principale de cette insuffisance rénale est la déposition de lipides au niveau des reins ainsi que l'accumulation de petites vésicules multilamellaires formées de phospholipides et de cholestérol libre, appelées LpX, qui sont néphrotoxiques et causent de l'inflammation et l'accumulation de cellules spumeuses dans le glomérule (51, 55). Comme pour la FED, les patients FLD ne sont généralement pas prédisposés à développer une athérosclérose précoce, possiblement parce que la LCAT ne peut estérifier le cholestérol plasmatique. La CETP ne pouvant transférer les TG des VLDL aux HDL contre des CE, il y a moins de formation de LDL et le LDL-C est pathologiquement très réduit. De plus, comme pour les FED, il y a accumulation de pré $\beta$ -HDL, ce qui pourrait être protecteur en favorisant un efflux de cholestérol plus important des tissus périphériques (48, 51).

Les symptômes présentés plus haut sont la norme, mais il peut arriver que le phénotype FLD soit très différent entre deux patients, et ce même lorsqu'ils proviennent d'une même famille. Par exemple, Alexis Baass et son équipe (56) ont présenté le cas de deux frères canadien-français atteints de FLD, mais avec des phénotypes très différents. L'un avait un faible taux de triglycérides sanguins et de cholestérol total, ainsi que la présence de LpX. L'autre présentait une hypertriglycémie ainsi qu'un plus haut taux de cholestérol total et aucune LpX. Des analyses génétiques ont révélé que les deux frères avaient des génotypes différents au niveau de l'apoE :  $\epsilon 3/\epsilon 3$  pour le premier et  $\epsilon 3/\epsilon 2$  pour le deuxième. Les auteurs ont suggéré que la présence d'ApoE  $\epsilon 2$  a pu être responsable d'un ralentissement dans l'élimination des VLDL, ce qui a mené à une hypertriglycémie chez ce patient. Ainsi, d'autres molécules peuvent avoir une influence importante sur le phénotype observé chez les patients FLD.

Au niveau de l'effet des mutations sur la LCAT, puisqu'il existe plus de cas répertoriés de FLD que de FED, les mutations responsables de la FLD sont mieux caractérisées. Piper et al. (39) ont examiné la localisation de certaines de ces mutations sur leur modèle de LCAT cristallisée. Il apparaît que la plupart des mutations causant la FLD se situent autour du centre catalytique de la protéine, interférant avec l'activité enzymatique ou la liaison du substrat. Quelques mutations affectent le repliement de la protéine, empêchant son excrétion. Finalement, quelques mutations affectent le couvercle responsable de l'interface eau-lipides (39).

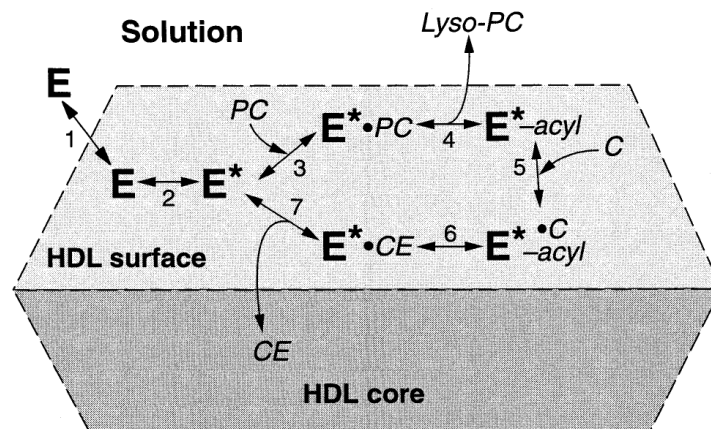
### **1.3.4 Fonction et réaction enzymatique**

La LCAT a une double fonction de phospholipase et d'acyltransférase (de façon similaire aux acyl-CoA : cholesterol acyltransferases (ACAT 1 et 2) intracellulaires) et elle est responsable de l'estérification du cholestérol libre dans le plasma. Pour ce faire, elle hydrolyse l'acide gras d'un phospholipide en position *sn*-2 puis le transestérifie sur le groupement 3-hydroxyle du cholestérol. Cette réaction consomme donc un cholestérol libre (CL) et un phospholipide (PL) (57) pour produire un ester de cholestérol (CE) et un lysophospholipide (LysoPL) (58).



**Figure 7. Action enzymatique simplifiée de la LCAT**

Ana Jonas a bien décrit les étapes de la réaction enzymatique de la LCAT dans une revue publiée en septembre 2000 (Figure 8) (42) :



**Figure 8. Étapes de la réaction enzymatique de la LCAT.**

Légende: E représente la LCAT, E\* la LCAT activée par apoA-I, E\*-acyl est la forme acylée de l'enzyme. PC et C sont les substrats de la LCAT et LysoPC et CE les produits. Tiré de Jonas A. 2000 (42).

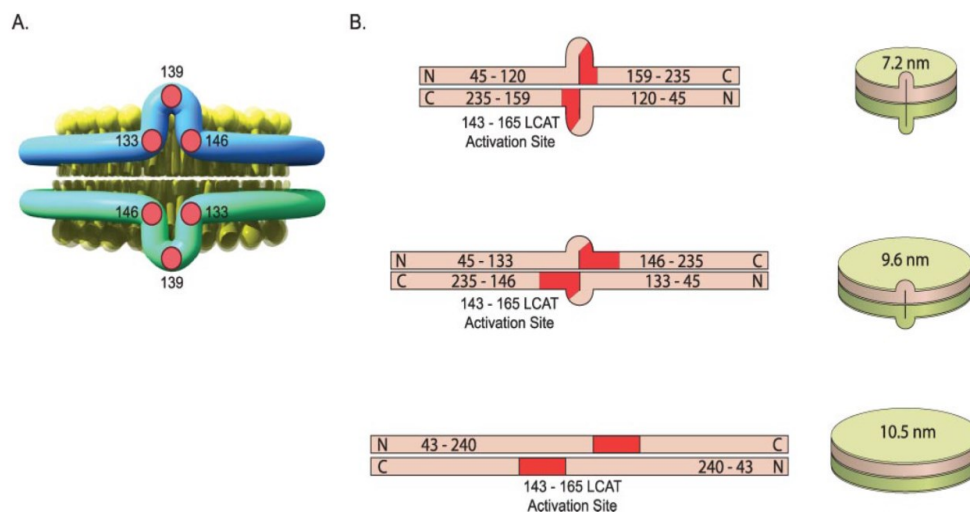
La LCAT circule généralement dans le plasma attachée de façon réversible aux lipoprotéines (59). La réaction enzymatique commence donc par la dissociation de la LCAT d'une lipoprotéine et l'arrimage de la protéine à une nouvelle HDL, suivi de son activation par l'apoA-I. Le complexe enzymatique activé peut ensuite hydrolyser une PC et former un complexe acyle enzyme avec l'acide gras hydrolysé. La LPC est habituellement relâchée dans le plasma, et la chaîne acyle est transférée sur le groupement 3-hydroxyle d'un cholestérol, formant un ester de cholestérol. Ce dernier, par sa polarité diminuée par rapport au

cholestérol libre et aux PC, va migrer vers le centre de la lipoprotéine. Toutefois, dans une situation où un cholestérol libre ne serait pas disponible, la LCAT est capable de réacyler une LPC pour former une nouvelle PC. La plupart des réactions enzymatiques de la LCAT sont réversibles, mais la réaction inverse n'est pas favorisée d'un point de vue thermodynamique (42).

Plusieurs études fonctionnelles sur la LCAT ont permis de déterminer quels étaient ses substrats optimaux. Premièrement, si l'on considère les groupements polaires des PL, la LCAT possède une forte affinité pour les PL éthanolamine et choline, mais presque aucune affinité pour les autres types de PL (inositol, sérine) (42). Sur une HDL, les PC représentent plus de 80% des PL, la LCAT travaille donc principalement sur ce lipide. Deuxièmement, la sphingomyéline est un inhibiteur de la LCAT, particulièrement lorsque présente en trop grande concentration sur les lipoprotéines (42, 60). Finalement, la longueur des acides gras en position sn-2 sur les phospholipides peut aussi modifier l'affinité de la LCAT. La LCAT humaine montre une préférence pour les acides gras longs (de 16 à 20 carbones) (61). En mesurant l'apparition de CE dans le plasma suite à l'action de la LCAT, il apparaît que près de 60% des esters produits sont des CE(18:2) (62). Les autres CE les plus abondants sont les CE(20:4), CE(18:1) et CE(16:0) (tous entre 10 et 15%) (62). Ces résultats confirment que la LCAT est active surtout au niveau des PC ayant ces acides gras en position sn-2. La seule exception est le CE(16:0); le palmitate (C16:0) se retrouve rarement en position sn-2 sur les PC, mais il est connu que la LCAT est capable d'hydrolyser l'acide gras en position sn-1 lorsque la position sn-2 est occupée par un acide gras incompatible, ce qui explique probablement l'apparition de cet ester de cholestérol (42). Un des objectifs de notre étude sera de vérifier l'affinité de la LCAT pour ces lipides. Il est à noter que ces résultats ne concernent que la LCAT humaine. En effet, la LCAT est hautement hétérogène dans le monde animal, et par exemple, la LCAT de rongeur montre une plus forte préférence pour l'arachidonate (C20:4) que pour le linoléate (C18:2) (62).

Ensuite, la majorité de l'activité de la LCAT se retrouve au niveau des HDL car l'apolipoprotéine majeure des HDL, l'apoA-I, est son activateur principal (63). Le mode d'activation de la LCAT par l'apoA-I n'est pas complètement compris, mais un modèle suggère que l'apoA-I adopte sur les HDL la forme d'une double ceinture avec une boucle (Figure 9). Sur

cette boucle, les résidus 143 à 170 de chacune des apoA-I sont placés à l'opposé l'un de l'autre et sont impliqués dans l'activation de la LCAT (64, 65). À mesure que la HDL augmente en taille (et diminue en densité), la double ceinture d'apoA-I s'étire, ce qui diminue progressivement la taille de la boucle et le potentiel de celle-ci d'activer la LCAT. Cette boucle semblerait aussi être importante pour la liaison de la LCAT aux HDL par la création de pont hydrogènes ou d'interactions ioniques (65). Toutefois, la LCAT possède aussi une faible activité sur les lipoprotéines contenant de l'apoB (LDL, VLDL), où l'apoE pourrait servir d'activateur (63). De même, l'apoE est l'activateur principal de la LCAT au niveau du liquide cébrospinal (66).



**Figure 9. Modèle « double ceinture avec boucle » de la conformation de l'apoA-I sur les HDL.** À mesure que la taille de la HDL augmente, les résidus responsables de l'activation de la LCAT (en rouge) s'éloignent. Tiré de Martin DDO. 2006 (64).

Finalement, toutes les fonctions de la LCAT ne sont pas encore connues et des recherches *in vitro* ont démontré qu'elle est, en tant que phospholipase A2, capable d'hydrolyser le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (67) ainsi que les acides gras à courte chaîne des phospholipides oxydés (68). Il s'agit toutefois de rôles potentiels, et l'importance physiologique de ces activités n'est pas connue.

### 1.3.5 Mesures et calculs de l'activité LCAT

Il est possible de mesurer l'activité de la LCAT selon deux points de vue : endogène et exogène. La mesure endogène est une mesure de l'estérification du cholestérol (activité LCAT) présent dans les lipoprotéines naturelles du plasma testé. Cette mesure est fortement dépendante de la composition lipidique du plasma, et dans une situation où deux échantillons de plasma auraient la même quantité de LCAT, un échantillon de plasma composé de beaucoup de préβ1-HDL résultera en une plus forte estérification que celui composé principalement de HDL<sub>2</sub>. C'est donc une mesure de l'activité « réelle » de la LCAT dans le plasma des patients.

À l'inverse, la mesure exogène implique de tester l'activité de la LCAT sur un substrat artificiel en condition saturante de l'enzyme. Pour ce faire, du plasma dilué est ajouté à un mélange de protéoliposomes chargés en cholestérol et en PC et le taux d'estérification est mesuré (69). La mesure exogène est indépendante de la composition en lipoprotéines du plasma elle mesure donc l'activité enzymatique totale de la LCAT. La mesure exogène est essentielle pour valider le type de déficience (FED ou FLD) d'un porteur hétérozygote pour une mutation de la LCAT.

Il existe plusieurs façons de calculer l'activité de la LCAT à partir de ces mesures, mais deux calculs sont particulièrement utilisés, le FER et le CER (37, 70). Le FER est un calcul du taux d'estérification du cholestérol libre; il est mesuré comme le pourcentage de cholestérol libre du plasma estérifié sur un laps de temps donné. Son équation est la suivante :

$$\text{FER} = \left( \frac{\text{Cholestérol libre } T_{4^{\circ}\text{C}} - \text{Cholestérol libre } T_{37^{\circ}\text{C}}}{\text{Cholestérol libre } T_{4^{\circ}\text{C}}} \right) \div X \text{ heures} \times 100\%$$

**Figure 10.** Équation du calcul FER de l'activité LCAT.  $T_{4^{\circ}\text{C}}$  représente la quantité de cholestérol libre à la température 4°C (condition contrôle),  $T_{37^{\circ}\text{C}}$  représente la quantité de cholestérol libre à la température 37°C (condition activée).

La deuxième mesure est le CER, soit simplement la quantité de cholestérol estérifié (en masse) par heure par litre de solution ( $\mu\text{g/h/L}$ ).

$$CER = \frac{\text{Cholestérol libre } T_{4^{\circ}\text{C}} - \text{Cholestérol libre } T_{37^{\circ}\text{C}}}{X \text{ heures} \times Y \text{ volume}}$$

**Figure 11. Équation du calcul CER de l'activité LCAT.**

La mesure de FER a l'avantage sur le CER d'être possible en condition de mesure semi-quantitative, puisqu'il s'agit d'un pourcentage qui ne fait pas appel aux concentrations absolues de cholestérol libre. L'appellation  $\text{FER}_{\text{HDL}}$  est souvent utilisée pour dénoter la mesure de FER sur du plasma déplété en lipoprotéines contenant de l'apoB par les techniques de précipitation classiques (71) (polyéthylène glycol (PEG), phosphotungstate, héparine ou dextran), qui ne contient alors que des HDL. Les calculs de  $\text{FER}_{\text{HDL}}$  et de CER ont été mis au point par Milada Dobiášová et son équipe (37, 70, 72, 73) pour mesurer l'activité de la LCAT à l'aide de cholestérol radioactif, mais ils peuvent être utilisés pour une mesure de cholestérol libre par test enzymatique ou par LC-MS.

### 1.3.6 Rôle dans la maladie athérosclérotique

Malgré son rôle essentiel dans la maturation des HDL, il n'y a pas actuellement de consensus sur le rôle exact de la LCAT dans le développement de la maladie athérosclérotique. Le fait que les sujets déficients en LCAT ne présentent généralement pas plus d'athérosclérose que la population moyenne semble indiquer que la LCAT n'est pas impliquée dans le développement de la maladie (51), mais d'un autre côté certains modèles animaux suggèrent le contraire. Récemment, des études de phase 1 ont été effectuées pour tester l'effet de l'infusion de LCAT recombinante (LCATrh) chez des sujets humains (40, 41); ces études, ainsi que celles qui vont suivre devraient permettre d'arriver à une conclusion sur le potentiel de la LCAT comme outil thérapeutique dans la maladie athérosclérotique.

### 1.3.6.1 Modèles animaux

L'effet de l'augmentation ou de la diminution de l'activité de la LCAT a été testé chez plusieurs modèles animaux, avec des effets variables selon les modèles. Chez la souris nourrie avec une diète athérogène, la surexpression de LCAT augmente la quantité de HDL-C, mais aussi la charge athérosclérotique (74). Il semblerait que la surexpression de la LCAT chez ces souris modifie la structure et la fonctionnalité des HDL. Celles-ci augmentent en taille et deviennent de mauvais accepteurs de cholestérol (74). Ces grosses HDL sont aussi moins bonnes pour livrer les CE au foie et même la surexpression de SR-BI causée par l'augmentation du HDL-C n'arrive pas à rétablir les niveaux normaux de CE dans le foie (75). Toutefois, les souris ont un profil lipidique très différent de l'homme, car entre autres, elles n'expriment pas de CETP. Lorsque les souris transgéniques expriment la CETP simienne, le profil lipidique est humanisé et les souris ne présentent pas plus d'athérosclérose lorsque la LCAT est surexprimée (75). Il est à noter toutefois que ce genre de surexpression augmente fortement la concentration plasmatique en LCAT (jusqu'à 100 fois) (74). Lorsque la LCAT est surexprimée de façon plus modeste (environ 10 fois plus), la surexpression ne semble pas athérogène, même sans l'ajout de CETP (76). À l'inverse, l'induction d'une déficience en LCAT chez la souris semble protectrice, possiblement car les niveaux de LDL-C étaient eux aussi réduits lorsque les souris étaient nourries d'une diète riche en gras et en cholestérol (77, 78).

Au niveau du lapin, qui est beaucoup plus proche de l'humain au niveau du profil lipidique ainsi qu'au niveau de la maladie athérosclérotique, les recherches semblent pointer vers un rôle protecteur de la LCAT. Les lapins chez qui la LCAT a été surexprimée présentent un HDL-C et un LDL-C plus élevé et sont mieux protégés contre l'athérosclérose (57). Pour que la LCAT soit protectrice cependant, les lapins doivent avoir un récepteur des LDL (rLDL) fonctionnel, sans quoi il y a accumulation d'oxLDL, ce qui finit par augmenter la charge athérosclérotique (75).

Finalement, la surexpression de la LCAT chez les singes-écureuils augmente le HDL-C et accélère le catabolisme ainsi que la sécrétion de l'apoA-I. Les HDL contiennent plus de cholestérol, mais la quantité d'apoA-I totale ne change pas, ce qui indique que les HDL sont



plus grosses, plutôt que plus nombreuses (79). L'expression de LCAT a aussi diminué les niveaux de LDL-C en augmentant le catabolisme des LDL (déterminé par le temps de résidence de lipoprotéines radio marquées), mais comme les singes-écureuils ont un profil LDL différent de celui de l'homme, les auteurs n'ont pas généralisé cet effet au modèle humain (79).

Au niveau animal, la surexpression de la LCAT semble donc protectrice, mais comme aucun de ces modèles ne représente parfaitement l'homme, des études chez l'homme sont inévitables pour tirer une conclusion sur l'effet de la LCAT dans l'athérosclérose.

#### **1.3.6.2 Études humaines**

Il y a peu d'études humaines sur le rôle de la LCAT dans la maladie athérosclérotique, car la déficience en LCAT est rare. Malgré tout, puisque les études animales sont peu concluantes, certains chercheurs se sont penchés sur la question. Comme mentionné à la section 1.3.3 sur les maladies génétiques, les sujets déficients en LCAT n'ont généralement pas plus d'athérosclérose que la population normale (48). Ceci peut sembler curieux, étant donné le rôle important de la LCAT dans la biogenèse des HDL, mais il apparaît que les sujets déficients en LCAT ont une forte concentration plasmatique en pré $\beta$ -HDL; or les pré $\beta$ -HDL sont de très bons accepteurs de cholestérol, l'efflux de cholestérol chez les sujets déficients en LCAT n'est donc généralement pas affecté (80). De plus, les sujets atteints d'une déficience complète en LCAT ont moins de particules LDL, ce qui est protecteur dans la maladie athérosclérotique (52). Cependant, les HDL ne font pas que de l'efflux de cholestérol, elles sont aussi capables d'agir comme molécules anti-inflammatoires et anti-oxydantes. De ce côté, la déficience en LCAT diminue le potentiel antioxydant des HDL, et augmente légèrement la quantité de phospholipides oxydés sur les LDL, mais dans l'ensemble, l'oxydation des lipides ne semble pas plus importante (81).

Quelques études ont quand même réussi à faire ressortir des différences entre les sujets déficients en LCAT et les sujets sains au niveau du risque de maladies cardiovasculaires, mais parfois avec des conclusions opposées. Par exemple, une étude sur une cohorte de 47 hétérozygotes avec 58 témoins familiaux a démontré que les porteurs hétérozygotes d'une mutation de la LCAT avaient une épaisseur intima-media (IMT) de la carotide légèrement plus

élevée que les témoins (0.623 contre 0.591 mm) (82). Cependant, une autre étude, cette fois basée sur l'analyse de mutations génétiques de la LCAT chez 10 281 participants à l'étude sur les maladies cardiovasculaires de la ville de Copenhague (CCHS) et 50 523 participants de l'étude sur la population générale de Copenhague (CGPS), n'a pas trouvé d'association entre la présence de mutations génétique de la LCAT et le risque d'avoir un infarctus du myocarde (83). Dans ces deux études cependant, le faible nombre de sujets déficients en LCAT (et pour la plupart hétérozygotes) rend difficile une analyse poussée de l'effet de ces déficiences chez l'homme. Dans l'ensemble, la déficience en LCAT ne semble pas avoir d'effets bénéfiques ou néfastes au niveau de la santé cardiovasculaire.

### **1.3.6.3 Traitement par LCAT humaine recombinante**

Puisque la perte de fonction de la LCAT ne semble pas avoir d'effet au niveau des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques, il est intéressant d'évaluer l'effet qu'une augmentation de sa concentration plasmatique pourrait avoir. Les premiers tests de remplacement de la LCAT par infusion de LCAT humaine recombinante ont été réalisés avec succès chez la souris en 2010 (84) et dans le plasma humain déficient en LCAT en 2013 (85). Dans les deux cas, l'ajout de LCAT permettait de retrouver un profil lipoprotéique normal, ce qui était encourageant pour le traitement des patients FLD, chez qui les déficiences rénales causées par la perte d'activité de la LCAT provoquent une mort prématurée. Le premier traitement de remplacement enzymatique chez l'homme a été effectué au National Heart, Lung and Blood Institute du National Institute of Health par l'équipe du Dr Alan T. Remaley (41). L'injection pendant environ 8 mois de LCAT recombinante (ACP-501) a été bien tolérée par le patient, et a permis de corriger l'anémie ainsi que le profil lipidique du patient. Cependant, le patient présentait une insuffisance rénale sévère, et bien que l'infusion d'ACP-501 a permis de stabiliser l'état du patient, elle n'a pas pu renverser la perte de fonction rénale qui était déjà très avancée.

L'ACP-501 a aussi été testé chez l'humain dans une étude de phase 1b. 4 cohortes avec une maladie coronaire stable et un faible HDL-C ont reçu une dose unique variable d'ACP-501 et un suivi a été effectué pendant 28 jours. La LCAT a été bien tolérée, et la dose la plus élevée

(13,5 mg/kg) a augmenté le HDL-C de 42% (40). Des études de phase 2 avec l'ACP-501, reformulé et renommé MEDI-6012, sont présentement en cours, commanditées par MedImmune (86).

## 1.4 Objectifs et hypothèses

Il n'existe pas actuellement de technique de pointe pour mesurer l'activité de la LCAT; il n'est possible de mesurer son activité qu'à l'aide de marqueurs radioactifs du cholestérol ou par le dosage enzymatique du cholestérol ou des esters de cholestérol. Chacune des méthodes présente leurs désavantages: les méthodes radioactives sont plus toxiques pour l'environnement et nécessitent une certification en radioactivité, tandis que les méthodes enzymatiques ne mesurent qu'un seul type de molécule et demandent un grand volume d'échantillon. La mise au point d'une méthode de mesure plus moderne pourrait améliorer nos connaissances sur la LCAT. Dans cette optique, mon projet de maîtrise s'est concentré sur la preuve de concept d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité de la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), une enzyme impliquée dans le métabolisme des HDL, par une méthode moderne de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Cette méthode a pour avantage la possibilité de détecter de façon exhaustive les changements en produits et substrat de la LCAT suite à l'incubation du plasma, ce qui pourrait servir à découvrir de nouveaux biomarqueurs de l'activité de la LCAT ou de la maladie athérosclérotique.

Mon projet de maîtrise avait donc pour objectif de :

1. Comparer l'efficacité d'une méthode LC-MS de mesure de l'activité endogène de la LCAT vs la méthode enzymatique standard.
  - L'activité endogène de la LCAT est privilégiée car elle représente la situation réelle de l'enzyme et elle directement reliée au profil en HDL des échantillons. L'activité endogène de la LCAT pourrait aussi être reliée au risque cardiovasculaire.

2. Identifier de nouveaux marqueurs lipidiques (substrat et produits) de l'activité LCAT et développer nos connaissances sur les substrats (et produits) de la LCAT au niveau moléculaire.
3. Vérifier l'effet sur le profil lipidique du plasma de l'ajout de LCATrh.
4. Évaluer l'application de la méthodologie à des échantillons cliniques de la Biobanque ICM, avec comme sous objectif l'identification de biomarqueurs potentiels du risque cardiovasculaire.

Au niveau de nos hypothèses, nous croyons que l'analyse de l'activité de la LCAT par LC-MS devrait nous permettre d'observer:

- Une diminution de l'abondance du cholestérol libre ainsi que des PC, particulièrement celles avec un acide gras de type 18:1 (oléate), 18:2 (linoléate) et 20:4 (arachidonate) en position sn-2.
- Une augmentation de l'abondance des LPC, particulièrement celles avec un acide gras de type 16:0 (palmitate) et 18:0 (stéarate) ainsi que des esters de cholestérol, particulièrement les CE(18:1), CE(18:2) et CE(20:4).

De plus, ces changements devraient être amplifiés par l'ajout de LCATrh au plasma avant l'incubation.

## **2 Méthodologie**

### **2.1 Analyse de l'activité de la LCAT par méthode enzymatique/colorimétrique**

La plupart des tests de l'activité LCAT ont été effectués avec du plasma groupé. Ce plasma groupé provenait de Bioreclamation IVT et était constitué à partir d'un groupe de 20 donneurs sains. Le même lot a été utilisé pour toutes les expériences utilisant du plasma groupé. Les autres des tests correspondaient au volet Biobanque et utilisaient du plasma provenant de participants de la Biobanque de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM). Les donneurs sont séparés en deux groupes : le groupe « Témoins » est formé de donneurs n'ayant pas eu d'évènements coronariens tandis que le groupe « Cas » est formé de donneurs ayant eu un évènement coronarien comme un infarctus du myocarde (IM) ou une procédure de revascularisation (ICP/CABG) suite à une MCAS présentant des signes cliniques comme une plaque d'athérome importante.

Puisque le projet visait à comprendre les effets de la LCAT, et qu'elle est principalement active au niveau des HDL, les échantillons de plasma (groupé et Biobanque ICM) ont été déplétés des lipoprotéines contenant de l'apoB avant d'effectuer les tests d'activité de la LCAT. La déplétion a été effectuée par l'ajout de PEG 6000 (20% (p/v) dans la glycine 200 mM, pH 7,4) (PEG et glycine, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) au plasma dans un ratio 0,4:1 (PEG:plasma). Le mélange a été homogénéisé par vortex pendant 5 secondes, incubé 20 minutes à 4°C puis centrifugé 30 min (10 000g à 4°C) pour sédimenter le précipité (qui contient les lipoprotéines contenant avec apoB). Le surnageant a été récupéré pour faire les tests subséquents.

#### **2.1.1 Activation de la LCAT par incubation du plasma à 37°C**

La LCAT estérifie principalement le cholestérol libre des HDL en esters de cholestérol. Une façon simple de mesurer son activité endogène (dépendante du profil lipoprotéique du

donneur) est de mesurer les changements en cholestérol libre du plasma déplété lorsqu'il est incubé pendant un laps de temps donné. Pour ce faire, deux aliquotes indépendantes ont été créées à partir du même échantillon de plasma déplété. L'une des aliquotes a été incubée pendant 2 heures dans un bain chauffant à 37°C (une cinétique sur 3 heures a été effectuée et 2 heures était un temps optimal pour nos échantillons) tandis que l'autre a été incubée en parallèle pour la même durée, mais à 4°C sur glace au réfrigérateur. Puisque la LCAT n'est pas active à 4°C, cet échantillon sert de contrôle sans estérification. L'absence d'estérification à 4°C a été vérifiée en comparant la quantité de cholestérol libre des aliquotes à 4°C (2 heures) avec des aliquotes non incubées (4°C). Une fois l'incubation terminée, les échantillons étaient soit immédiatement dosés en cholestérol libre par méthode enzymatique ou congelés à -80°C pour être analysés subséquemment par LC-MS.

#### **2.1.1.1 Ajout de LCAT recombinante au plasma**

Des d'échantillons ont aussi été incubés avec une gamme de concentrations de LCAT recombinante humaine (LCATrh) (Un don de MedImmune, Gaithersburg, Maryland) : 0, 4, 8, 16, 32 et 72 µg/mL. Il est à noter que la concentration sanguine normale de la LCAT est d'environ 8 µg/mL, la dose de LCATrh recombinante de 8 µg/mL correspond donc à un doublement de la concentration plasmatique normale. La LCATrh a été ajoutée aux échantillons de plasma après la déplétion et la LCAT a été activée avec le protocole standard d'activation de la LCAT. Les échantillons contenant de la LCATrh ont été traités et analysés en parallèle entre la méthode enzymatique et la méthode LC-MS.

#### **2.1.2 Dosage du cholestérol par kit Wako Free Cholesterol E**

Suite à l'incubation, le cholestérol libre a été dosé avec le kit Wako Free Cholesterol E (Wako Diagnostics, Richmond, VA) utilisé dans une version dite « microméthode » en plaques de 96 puits. Les réactifs ont été reconstitués selon les directives du manufacturier puis les échantillons à doser ont été distribués dans la microplaque. Une courbe standard a été effectuée en duplicata avec la solution standard de cholestérol en utilisant un volume de 12,5 µl pour chacun des échantillons d'une dilution en série du standard (12,5; 5; 2,5; 1,25;

0.63; 0.31; 0.16 et 0 µg), tandis que des volumes de 40 µl ont été utilisés pour le plasma (aucune dilution n'est typiquement nécessaire pour le plasma déplété). Une fois les échantillons dans la plaque, 200 µl de réactif Wako ont été ajoutés à chacun des puits et la plaque a été recouverte avec un film adhésif et incubée à 37°C pendant 15 minutes. Après l'incubation, la plaque a été refroidie 15 minutes à la température pièce et l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT). L'absorbance des échantillons a été rapportée sur la courbe standard avec un facteur de correction pour la différence de volume afin de déterminer la quantité en cholestérol libre de ceux-ci.

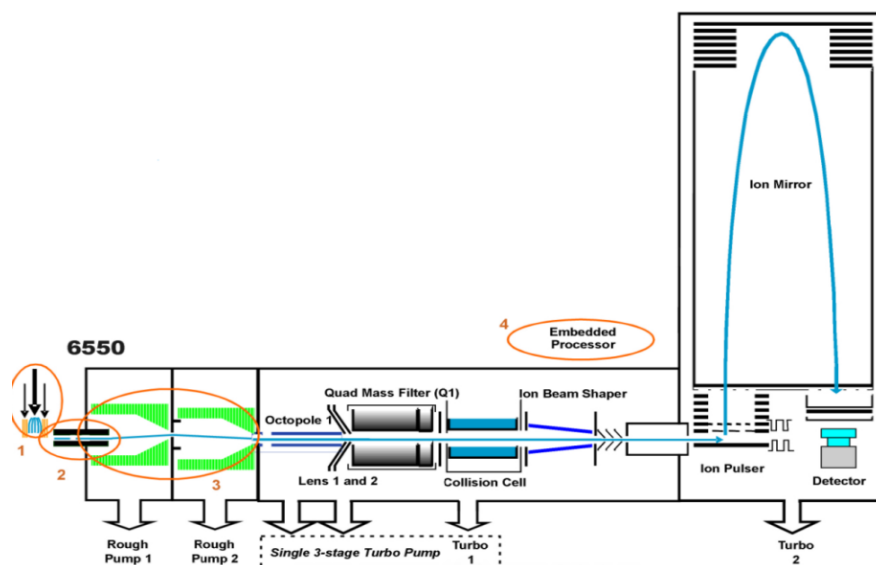
## **2.2 Analyse de l'activité de la LCAT par spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (MS) est l'outil parfait lorsque l'on veut étudier en détail la structure d'un analyte, en détecter la présence ou encore en mesurer l'abondance, et ce même dans une matrice complexe (87). En couplant le MS avec un appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), l'on peut séparer les composants d'un échantillon en fonction de leur temps de rétention de la phase stationnaire de la colonne de chromatographie. Les composants sont élués de la phase stationnaire avec un gradient de solvants spécifiques sur un laps de temps donné, ce qui augmente le nombre d'entités détectables ainsi que la précision des mesures. La combinaison de ces deux appareils s'appelle un LC-MS. Il existe plusieurs types d'instruments LC-MS, mais ils ont tous en commun certains éléments de base. L'on retrouve d'abord un chromatographe en phase liquide qui sépare et élue, sur un laps de temps donné, l'échantillon à étudier vers le spectromètre de masse dont la première composante est une chambre d'ionisation, responsable de l'ionisation des analytes présents dans la solution. Les ions sont ensuite propulsés vers une chambre sous vide dotée de plusieurs aimants, ce qui permet l'élimination des contaminants non ionisables et la séparation des ions en fonction de leur masse/charge (les éléments plus lourds sont moins déviés par le champ magnétique de

l'aimant). Finalement, les ions sont projetés par les aimants vers un détecteur, qui transforme le signal électrique des ions en un signal électronique amplifié et interprétable par un ordinateur (87). Ces quatre modules représentent les éléments de base d'un LC-MS, mais certains appareils modernes sont beaucoup plus complexes, ce qui augmente leur sensibilité et améliore leurs performances.

Dans le cadre de ce projet, un appareil iFunnel QTOF 6550 (Agilent Technologies) couplé à un HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) a été utilisé. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) était effectuée sur une colonne Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) qui permet d'éluer les lipides en fonction croissante d'hydrophobicité (les plus hydrophiles éluent en premier) grâce à un gradient entre deux solutions d'élution (décrites plus bas). Le spectromètre de masse (LC-QTOF-MS/MS) ionise l'effluent du HPLC grâce à un nébuliseur à jet d'électrons (ESI), qui transforme l'effluent en un aérosol de fines gouttelettes chargées électriquement. Le solvant composant ces gouttelettes s'évapore spontanément et les composés ionisés de l'échantillon sont envoyés vers une série de 3 chambres sous vide dotées d'aimants (octapôle-quadripôle-hexapôle) où les ions peuvent être enrichis, filtrés et fragmentés, avant d'être finalement envoyés vers une colonne de vol. La colonne de vol pulse les ions par groupe vers un détecteur qui mesure le temps de vol (TOF, time of flight) de chaque ion, ce qui permet de déterminer leur masse/charge (Figure 12) (88, 89). Lors de nos analyses par LC-MS, les mêmes plasmas et les mêmes protocoles de déplétion et d'activation de la LCAT que pour ceux des analyses enzymatiques ont été utilisés. Lors d'analyses concomitantes en méthode enzymatique et en méthode LC-MS, les échantillons étaient dupliqués entre les deux méthodes d'analyse afin de permettre des comparaisons.





**Figure 12. Diagramme de l'iFunnel QTOF6550 d'Agilent.** Le chemin des ions est indiqué en bleu.

Avant d'étudier l'activité de la LCAT en LC-MS, il faut d'abord extraire les lipides du plasma humain, car les autres composants du plasma : protéines, sels, etc., ne sont pas compatibles avec la méthode de LC-MS utilisée. Typiquement, les lipides sont extraits à l'aide de méthodes classiques d'extraction en milieu liquide, comme la méthode de Folch (90) ou de Bligh et Dyer (91). Ces méthodes ont fait leurs preuves, mais une méthode modifiée de la méthode MTBE, originalement mise au point par Matyash en 2008 (92), a été privilégiée pour nos extractions. Un des avantages de notre méthode MTBE modifiée sur les méthodes traditionnelles est la localisation de la phase organique contenant les lipides extraits : elle est au-dessus de la phase aqueuse, ce qui en facilite la récolte. Cette méthode a été mise au point et validée par les membres du laboratoire de lipidomique de la Dre Des Rosiers à l'ICM et est aussi performante que les méthodes traditionnelles tout en améliorant la reproductibilité et le recouvrement de certains lipides, particulièrement les phospholipides à ionisation négative (93).

### 2.2.1 Extraction liquide-liquide des lipides

L'extraction des lipides commençait par l'ajout de 7 standards externes groupés, soit 2,5 nmoles de LPC(13:0), PC(14:0/14:0), PC(19:0/19:0), PS(12:0/12:0), PE(17:0/17:0), PG(15:0/15:0) et 12,5 nmoles de d4-cholestérol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) dissouts dans de l'hexane/isopropanol 3:4 (v/v) dans des tubes de verre sodocalcique de 15 mL. Le contenu des tubes a été évaporé à sec sous jet d'azote, puis un volume de 750 µL de méthanol a été ajouté et les tubes ont été soniqués 1 minute sur glace. Ensuite, 100 µL de plasma déplété et 20 µL d'acide formique 1 M ont été ajoutés dans les tubes, les tubes ont été vortexés et un volume de 2,5 ml de MTBE a été ajouté. Les tubes ont été vortexés sur un multivortex pendant 5 minutes, un volume de 625 µL d'eau nanopure a été ajouté et les tubes ont été vortexés de nouveau sur un multivortex pendant 3 minutes, suivi d'une centrifugation de 5 minutes (angle 45°, 1000 g, 20°C)

Deux phases sont formées suite à la centrifugation. La phase organique supérieure, contenant les lipides, a été récoltée dans un nouveau tube de verre à l'aide d'une pipette pasteur. La phase inférieure a ensuite été réextraite par l'ajout de 2 mL de la phase supérieure d'une solution MTBE/méthanol/eau (10:3:2,5 v/v/v) suivi de 5 minutes de multivortex et d'une centrifugation de 5 minutes à 1000 g. La nouvelle phase organique supérieure a été récoltée et ajoutée à la première. La phase inférieure résultante a été extraite 2 fois par l'ajout à chaque fois de 2 ml d'acétate d'éthyle saturé en NaCl + 10 µL de HCl 10 M suivi de 2 min de multivortex et de 2 minutes de centrifugation à 1000 g. Les deux phases organiques supérieures ont été combinées avec les deux autres phases organiques précédentes et la solution résultante a été évaporée à sec durant 16 heures à l'aide d'une centrifuge sous vide (Christ RVC 2-25, Osterode, Germany) programmée pour 5 étapes (Tableau III) :

**Tableau III. Programmation de la centrifuge sous vide.** L'étape 4 est l'étape principale d'évaporation. L'étape 5 est une étape de maintien et peut être arrêtée à tout moment.

| Étapes                             | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Durée (hh:mm)                      | 00 :02 | 00 :01 | 00 :30 | 15 :00 | 10 :00 |
| Température (°C)                   | 25     | 25     | 25     | 30     | 25     |
| Pression de la pompe à vide (mbar) | 0,1    | 60     | 250    | 500    | 200    |
| Vitesse de centrifugation (RPM)    | 1000   | 800    | 800    | 700    | 700    |

Après les 16 heures, les lipides séchés ont été solubilisés par l'ajout de 205 µL de méthanol/chloroforme (2:1 v/v). Les tubes ont été soniqués 5 min, vortexés 15 secondes et centrifugés 30 secondes à 1000 g. La solution a ensuite été transférée dans une fiole à insertion en verre de 300 µL (J.G. Finneran, Vineland, NJ) et les lipides secs restants ont été solubilisés à nouveau dans 105 µL de méthanol/chloroforme suivant le même protocole. Les deux solutions ont été combinées dans la même fiole qui a été centrifugée 3 minutes à 1000 g puis la solution lipidique a été séparée dans 6 nouvelles fioles en fractions égales de 40 µL en évitant d'aspirer le culot. Les fractions ont été conservées à -80°C jusqu'à l'analyse LC-MS.

À chaque extraction, 3 contrôles de qualité étaient préparés en plus des échantillons de plasma: un échantillon de tampon Krebs (tampon physiologique servant de blanc) et un échantillon de plasma contrôle, tous deux extraits, ainsi qu'un échantillon non-extrait (constitué des standards externes ajoutés à une fiole contenant la solution finale de méthanol/chloroforme (2:1 v/v)). Le blanc permettait d'évaluer que l'appareil n'était pas contaminé et qu'il fonctionnait tel que prévu alors que le plasma contrôle et le contrôle non extrait permettaient d'évaluer que la sensibilité de l'appareil et l'intensité des lipides détectés étaient les mêmes entre les expériences.

## 2.2.2 Analyse par LC-MS

Les lipides extraits ont été décongelés sur glace puis soniqués 1 minute et vortexés 30 secondes avant d'être injectés dans le HPLC 1290 Infinity. Les échantillons ont été chargés sur la colonne de chromatographie Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 x 100 mm, 1,8µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Les volumes injectés étaient de 0,7 µL pour les contrôles qualité et de 1 µL pour les échantillons de plasma. L'élution était effectuée à 40°C avec un débit de 0,45 mL/min, utilisant une phase mobile A (acide formique 0,2% et ammonium formate 10 mM dans de l'eau) et B (acide formique 0,2% et ammonium formate 5 mM dans méthanol/acétonitrile/MTBE, 55:35:10 v/v/v). La programmation de l'élution était la suivante : 0-2 min, 50%B; 2-11 min, 50-85% B; 11-33 min, 85-94% B; 33-35 min, 94-98% B; 35-38 min 98-99,5% B; 38-82 min, 99,5% B et 82-83 min, 99,5-50% B, avec une période d'équilibration de 8 min permettant le retour aux conditions initiales. Les conditions d'ionisation de la source étaient les suivantes : température de la source, 325°C; débit du jet d'azote, 8 L/min; nébuliseur, 35 psi; voltage du nébuliseur :  $\pm 3500$  V, voltage du cône, 150 V. Une correction pour la masse exacte était appliquée durant l'acquisition des données grâce à 2 composés de référence (fournis par Agilent) injectés en continu dans le nébuliseur:  $C_5H_4N_4$  (purine) et  $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$  (HP-921). Le spectre de masse était acquis de  $m/z$  50 à 1700 et les balayages MS étaient collectés pendant 1 sec. Tous les échantillons ont été analysés en mode positif seulement, sauf lors de l'identification MS/MS. Le QTOF permet une analyse de la masse exacte des composés avec une résolution, dans les conditions optimales, de moins de 2 ppm d'erreur.

### 2.2.2.1 Analyse MS/MS des lipides

Le protocole précédent est utilisé pour toutes les analyses sur les échantillons de plasma. Toutefois, ce protocole ne permet pas d'identifier avec certitude tous les lipides associés aux  $m/z$  mesurées. Pour identifier les lipides correspondant au  $m/z$  et aux temps de rétention observés, il faut fragmenter ces lipides et étudier leur patron de fragmentation. Ce patron de fragmentation permet d'indiquer, par exemple, quels acides gras se retrouvent en position *sn*-1 et *sn*-2 d'un phospholipide. Ce genre d'analyse se nomme MS/MS; les lipides

d'intérêt sont filtrés en fonction de leur  $m/z$  par le quadripôle et transigent vers la chambre de collision (hexapole). Dans la chambre de collision, les lipides entrent en contact avec les molécules d'un gaz ionisant, ce qui cause leur fragmentation à des endroits précis où les forces moléculaires sont plus faibles. Les fragments sont ensuite détectés dans la chambre de vol (TOF) comme à l'ordinaire (89) (Figure 11). Il y a donc deux lectures de  $m/z$  par l'appareil, une fois sur l'ion précurseur choisi et une fois sur les ions produits, d'où le terme MS/MS.

Les balayages de MS/MS ont été collectés en mode positif et négatif pendant 500 ms pour chacune des  $m/z$  sélectionnées, avec une fenêtre de temps de rétention de 4 minutes. Les fichiers MS/MS ont été alignés avec les fichiers MS des mêmes échantillons et les patrons de fragmentation ont été analysés manuellement grâce à deux banques de données en lipidomique comme référence: Metlin ([metlin.scripps.edu](http://metlin.scripps.edu)) et Lipid Maps ([lipidmaps.org](http://lipidmaps.org)). L'identification des acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2 des lipides à cœur de glycérol (sauf les triglycérides) a été effectuée en regardant l'intensité relative des fragments, le signal du fragment de l'acide gras en *sn*-2 étant plus fort que celui de l'acide gras en *sn*-1 en mode d'ionisation négative (94).

### 2.2.3 Traitement des données

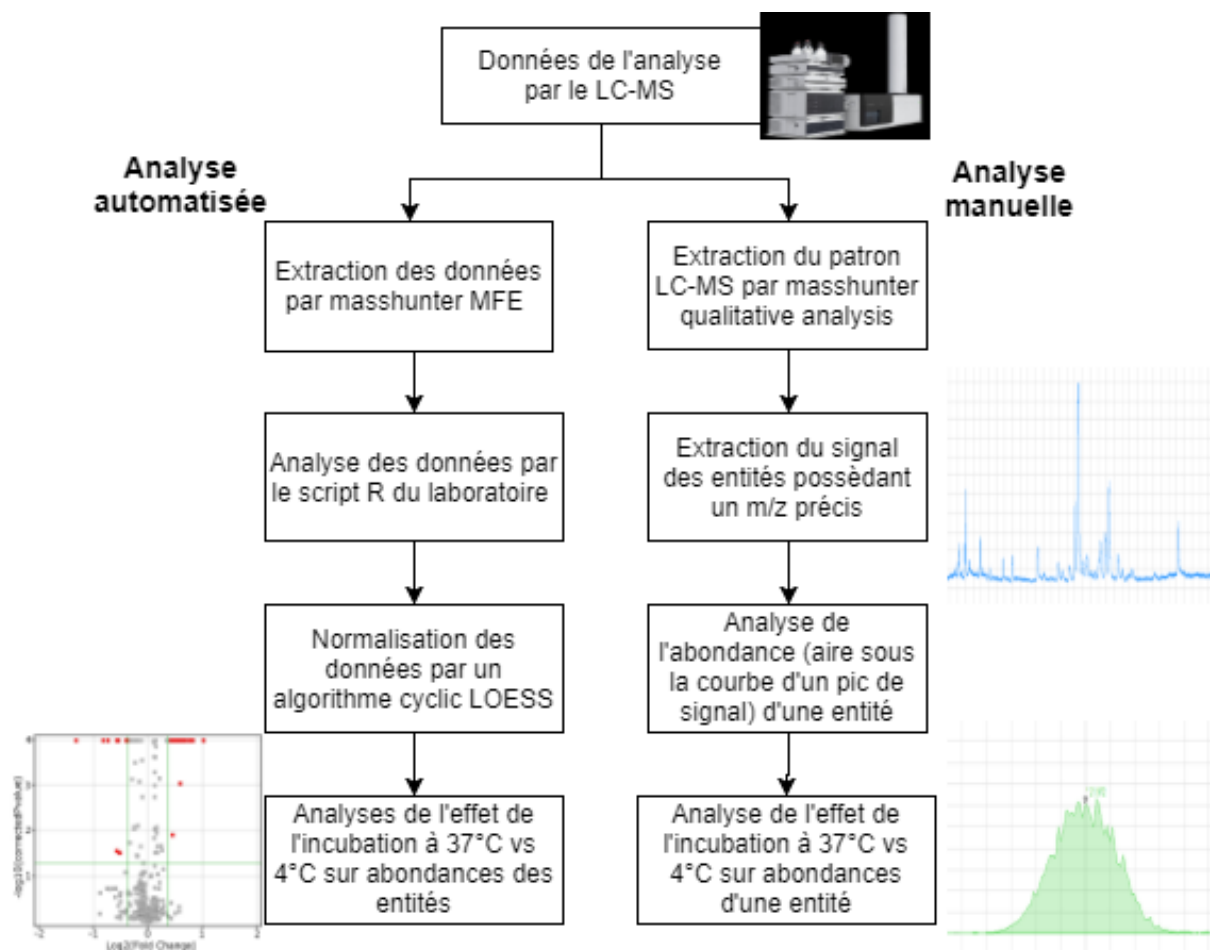
La première étape du traitement des données du LC-MS était une analyse automatisée avec la suite de programmes Mass Hunter Qualitative Analysis (version B.06 et B.07) d'Agilent. Un script maison en langage R (développé par Olivier Gingras pour la plateforme de lipidomique de la Dre Des Rosiers) a été utilisé pour interfacer avec les logiciels d'Agilent afin d'améliorer l'alignement des entités, de filtrer la présence d'adduits, de combiner les analyses en mode positif et négatif, de normaliser, d'imputer les valeurs manquantes et de corriger les différences entre les lots d'extraction. Les étapes d'analyse étaient les suivantes : 1) les entités, définies par une  $m/z$ , une intensité de signal et un temps de rétention étaient extraits des fichiers de données du LC-MS avec la fonction *Molecular Feature Extractor* (MFE) de Mass Hunter; 2) les entités étaient alignées entre les séries de LC-MS par sélection d'entités présentes dans tous les échantillons et distribuées sur toute la période de LS-MS comme références (script R); 3) Les pics d'intensité des entités étaient

extraits par la fonction *Find by Formula* de Mass Hunter; 4) les entités MS étaient ensuite filtrées pour la présence de doublons, la fréquence d'apparition dans les échantillons (seuil de  $\geq 80\%$ ) et la présence d'adduits (script R); 5) l'abondance de chacune des entités était extraite; 6) les valeurs manquantes étaient imputées avec un algorithme k-NN et elles étaient ensuite normalisées par un algorithme de régressions locales cycliques (cyclic LOESS) (script R).

Cette analyse automatisée permettait d'extraire les abondances de toutes les entités détectées, mais elle n'était que la première étape. Il fallait ensuite identifier quels lipides étaient les plus intéressants et les faire ressortir du bruit de fond. Pour ce faire, le  $\log_2$  de l'ampleur du changement d'abondance de chaque lipide suite à l'incubation (aussi appelé ratio de changement ou Fold Change, FC) était placé sur l'abscisse d'un graphique où l'ordonnée était le  $\log_{10}$  négatif de la signifiante statistique de ces changements. La signifiante statistique était déterminée par des tests de t de student corrigés pour un taux de fausses découvertes (FDR) de 5% selon la procédure de Benjamini-Hochberg (95) (nécessaire pour contrôler les erreurs statistiques de type 1 vu le très grand nombre de tests). Ce genre de graphique en nuage de points se nomme un « volcano plot » (graphique en volcan, voir la Figure 14 pour un exemple). En établissant des valeurs seuil pour le FC et la signifiante statistique (1,2 et 0,05 respectivement pour nos analyses), il est possible de sélectionner les lipides ayant un changement minimum d'abondance suite à l'incubation. Une fois les lipides d'intérêt isolés, l'on se servait des bases de données Metlin et Lipids Maps pour une identification sommaire des lipides à l'aide de leur m/z et leur temps de rétention. Les entités non identifiables dans ces deux bases de données étaient rejetées tandis que les lipides identifiés étaient ensuite analysés en MS/MS afin de tenter de confirmer leur identité.

La précédente méthodologie était utilisée pour toutes les analyses non ciblées, où l'on voulait étudier tous les changements en abondance de tous les lipides. Cependant, l'on voulait parfois vérifier l'effet de l'incubation sur certains lipides d'intérêts en lien avec l'activité de la LCAT, comme le cholestérol libre. Pour ce faire, les m/z de ces lipides étaient recherchés dans la banque de données du consortium Lipids Maps ou dans des publications

scientifiques et l'abondance de ces lipides était tirée manuellement des résultats de l'analyse automatisée. Dans les cas ambigus, les pics d'intensité des lipides pouvaient être extraits manuellement des données du LC-MS grâce au programme Mass Hunter Qualitative Analysis. Pour ce faire, l'on utilisait le logiciel pour extraire le signal de toutes les molécules dotées d'un  $m/z$  choisi, ce qui permettait l'obtention d'un graphique de l'intensité du signal en fonction du temps de rétention pour ce  $m/z$  en particulier. Dans le cas où il avait présence de doublons ou de fragments, l'on comparait les temps de rétentions avec ceux de la banque de données interne du laboratoire, ce qui permettait généralement l'élimination de ces problèmes. L'analyse des lipides présents au temps de rétention du pic de signal permettait aussi d'identifier certains cas. Le cholestérol libre, par exemple, affichait plusieurs pics de signal à des temps de rétention différents, mais la plupart de ces pics provenaient de la dégradation d'ester de cholestérol en source. L'extraction manuelle des pics nous permettait aussi de visualiser le patron LC-MS global des lipides et la plupart des lipides d'intérêts identifiés au long des analyses ont été visualisés de la sorte. Un autre avantage de l'environnement visuel était la possibilité de vérifier rapidement la qualité de la MS, en s'assurant par exemple que les temps de rétentions des lipides n'étaient pas trop différents entre les échantillons tout au long de la MS ou encore que la ligne de base du signal n'était pas modifiée.



**Figure 13.** Diagramme de l'analyse des données du LC-MS par méthode automatisée et par méthode manuelle.



## 3 Résultats

### 3.1 Validation de la méthode d'extraction

La méthode LC-MS utilisée dans ce projet avait été validée quelques années avant le début de mon projet par nos collaborateurs de la plateforme de lipidomique de l'ICM (96), mais ils n'avaient pas évalué le recouvrement du cholestérol libre. Dans le cadre de ce projet, la méthode d'extraction a donc été revalidée pour son application à l'extraction du cholestérol libre. Pour la validation de l'extraction de tous les lipides autres que le cholestérol libre, les standards avaient été ajoutés à du tampon Krebs puis ils avaient été extraits. Leurs abondances en LC-MS ont été comparées à celles des mêmes standards ajoutés à d'autres échantillons (sans extraction); mais dissouts dans du méthanol/chloroforme (2:1 v/v) (N=8 réplicats par condition, en une seule extraction). Le test de recouvrement du cholestérol libre a été effectué de façon un peu différente dans ce projet. Du cholestérol libre deutéré en 7 positions (d7-cholestérol) a été ajouté à du tampon Krebs avant le protocole d'extraction (échantillons extraits) et après le protocole d'extraction (échantillons non extraits). Il a aussi été ajouté à du plasma groupé et de l'eau, aussi avant et après l'extraction, afin d'évaluer l'effet de la matrice. Tous les échantillons ont été extraits dans un même lot (N=5 réplicats pour le Krebs et le plasma et N=3 réplicats pour l'eau). De plus, tous les tubes contenaient la même quantité de d4-cholestérol, toujours ajouté avant l'extraction. Le d4-cholestérol servait à corriger l'abondance du d7-cholestérol entre les échantillons.

La méthode d'extraction MTBE permet un très bon recouvrement des lipides testés (Tableau IV) : tous sauf le PA(18:1/18:1) avaient un recouvrement moyen supérieur à 80 %, avec des coefficients de variation (CV) inférieurs à 15 %. Plus spécifiquement, le cholestérol libre, qui est un substrat uniquement utilisé par la LCAT dans le plasma, avait un recouvrement moyen de 87 % dans le plasma déplété, avec un CV de 8,9 %. Le taux de recouvrement n'était pas affecté par la matrice, puisque le recouvrement dans le Krebs et l'eau était respectivement de  $85 \pm 15$  % et de  $88 \pm 7$  %. Toutefois, la matrice avait un effet sur l'abondance du d7-cholestérol. Celui-ci était en moyenne 30% plus abondant lorsqu'il

était extrait dans du plasma déplété (résultats non montrés). Ce résultat s'avérait difficile à prévoir, puisque d'une part, il est possible qu'une matrice complexe puisse diminuer l'efficacité de l'ionisation, mais d'autre part, il est aussi possible que le cholestérol endogène présent dans l'échantillon de plasma ait agi comme un transporteur pour le cholestérol deutéré, présent lui en moindre quantité. Finalement, il se peut qu'une plus grande concentration de cholestérol libre pendant l'ionisation améliore l'efficacité de celle-ci.

**Tableau IV. Tableau de recouvrement de standard représentant les grandes classes lipidiques.** Le recouvrement est défini comme l'abondance du lipide extrait sur celle du lipide non extrait. Résultats de 5 réplicats pour le d7-cholestérol et 8 réplicats pour les autres standards.

| Standards             | Recouvrement<br>moyen (%) | CV (%) |
|-----------------------|---------------------------|--------|
| <b>Stérols</b>        |                           |        |
| d7-Cholestérol        | 87                        | 8,9    |
| CE(18:2)              | 100                       | 8,7    |
| <b>Phospholipides</b> |                           |        |
| PA(18:1/18:1)         | 77                        | 16,7   |
| PS(18:0/18:2)         | 81                        | 9,3    |
| PE(18:1/18:1)         | 84                        | 10,1   |
| PG(15:0/15:0)         | 86                        | 11,8   |
| PC(18:0/18:0)         | 90                        | 7,1    |
| LPC(16:0)             | 84                        | 10,0   |
| <b>Sphingolipides</b> |                           |        |
| Sphingosine(d17:1)    | 89                        | 9,5    |
| Céramide(C17:0)       | 90                        | 9,6    |
| SM(d18:1/16:0)        | 88                        | 12,1   |
| <b>Glycérolipides</b> |                           |        |
| DG(16:0/18:1)         | 100                       | 9,7    |
| TG(16:0/16:0/16:0)    | 94                        | 9,4    |

### 3.2 Activité de la LCAT dans le plasma déplété

L'activité endogène de la LCAT a été mesurée dans le plasma déplété en lipoprotéines à apoB par 2 méthodes : une enzymatique et l'autre basée sur la LC-MS. L'activité endogène de la LCAT est très dépendante de la composition des HDL présentes dans le plasma, elle

peut donc varier de façon importante entre deux lots de plasma groupés. Pour cette raison, toutes les expériences sauf celle sur la cohorte Biobanque ICM ont été faites avec le même lot de plasma groupé dont le profil biochimique est normal (Tableau V).

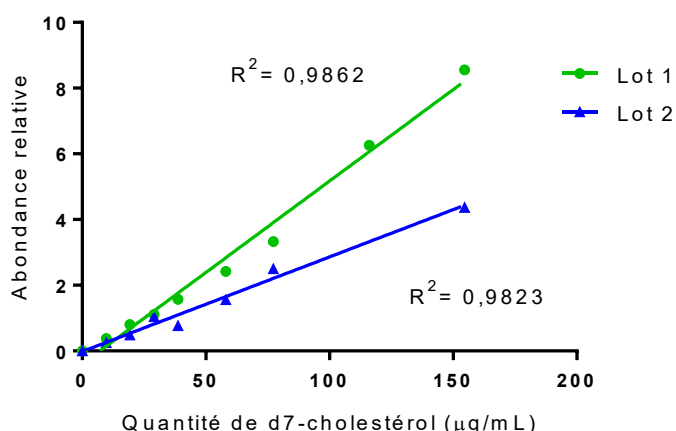
**Tableau V. Profil biochimique du plasma groupé utilisé pour les tests d'activité de la LCAT.** Toutes les valeurs biochimiques sont dans la normale. Les mesures ont été effectuées sur 3 aliquotes situées au début, au milieu et à la fin des stocks aliquotés.

|                         | Moyenne | Écart-type (ET) | CV (%) |
|-------------------------|---------|-----------------|--------|
| Cholestérol total, mM   | 4,40    | 0,03            | 0,6    |
| LDL-C, mM               | 2,80    | 0,06            | 2,0    |
| HDL-C total, mM         | 1,03    | 0,01            | 1,0    |
| TG, mM                  | 1,70    | 0,04            | 2,5    |
| apoA-I, mM              | 1,29    | 0,02            | 1,6    |
| apoB, mM                | 1,01    | 0,02            | 1,7    |
| Glucose, mM             | 6,20    | 0,10            | 1,6    |
| Bilirubine totale, mg/L | 6,07    | 0,42            | 6,9    |

Dans le cadre de ce projet, la mesure enzymatique du cholestérol libre, effectuée avec le kit Free Cholesterol E (Wako Diagnostics, Richmond, VA), a été considérée comme étant le « gold standard », celle-ci a donc servi de point de comparaison pour valider les résultats obtenus avec la spectrométrie de masse. Pour ce premier volet visant à comparer la méthode enzymatique et la méthode LC-MS au niveau des changements de CL, les analyses ont été menées sur un total de 5 expériences, chacune en triplicate. Le dosage enzymatique du cholestérol libre était effectué en microméthode avec le kit Free cholesterol E, tel que décrit précédemment. Pour la LC-MS, le cholestérol libre a été quantifié par l'ajout à l'échantillon d'une gamme de concentration de d7-cholestérol (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 et 400  $\mu\text{mol/L}$ ) couvrant les concentrations de cholestérol libre retrouvées normalement dans nos échantillons de plasma avant et après l'incubation. Ces concentrations de d7-cholestérol ont permis l'établissement d'une courbe de calibration pour le dosage du

cholestérol libre. Comme il fallait extraire les lipides des échantillons en deux lots à cause du nombre important d'échantillons, les échantillons formant la courbe de calibration ont été produits en double et insérés dans chacun des lots d'extraction.

Malheureusement, il est apparu suite à l'analyse des résultats que les deux courbes de calibration ne s'étaient pas comportées de la même façon. Aux mêmes concentrations de d7-cholestérol, le signal du lot 1 était plus fort que celui du lot 2; les deux courbes n'avaient donc pas la même pente (Figure 14). Cette situation a compliqué le dosage du cholestérol dans nos échantillons, et au final, nous avons décidé de doser les échantillons en utilisant leur droite respective comme courbe de calibration.



**Figure 14. Courbes de calibration de d7-cholestérol pour le dosage du cholestérol endogène.** L'abondance du d7-cholestérol était corrigée par l'abondance du standard de d4-cholestérol. Les courbes étaient effectuées en monoplicat dans chaque lot.

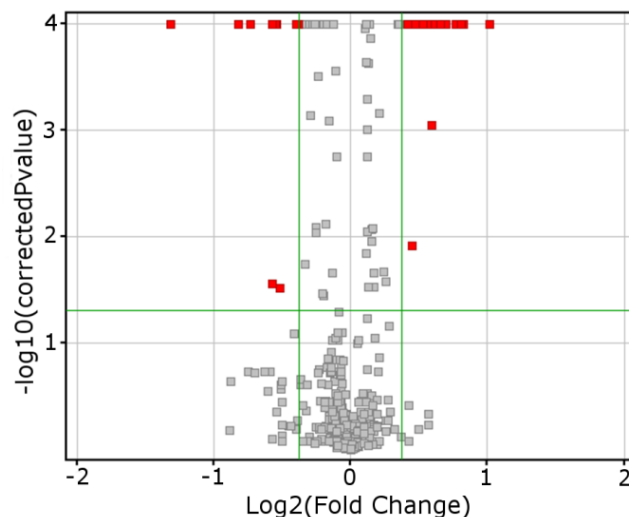
La concentration initiale en cholestérol libre de notre lot de plasma groupé était de  $86,14 \pm 5.9$  µg/mL et de  $146,00 \pm 11,0$  µg/mL tel que déterminé par la méthode enzymatique et LC-MS respectivement, soit une différence de 69.5 % ( $p \leq 0.001$ ) (Tableau VI). Après l'incubation de deux heures à 37°C, les concentrations étaient respectivement de  $56.21 \pm 4.3$  µg/mL et de  $93.10 \pm 11.19$  µg/mL, une différence de 65.6 % ( $p \leq 0.001$ ). Il y avait donc une

différence importante entre les quantités de cholestérol mesurées par les deux méthodes, possiblement causée par les problèmes avec les courbes de calibration en LC-MS. Le résultat du dosage du cholestérol libre en LC-MS n'est donc probablement pas valide. Toutefois, si l'on regarde spécifiquement la mesure de l'activité LCAT en pourcentage de baisse du CL, soit le  $FER_{HDL}$ , l'on remarque que les différences entre les méthodes disparaissaient. La méthode enzymatique mesurait un  $FER_{HDL}$  de 17,4 %, contre 18,1 % pour la LC-MS, soit une différence non significative de seulement 4% ( $p = 0,9076$ ) (Tableau VI). Donc, malgré l'obtention de deux courbes de calibration du d7-cholestérol en LC-MS, ce qui a possiblement causé une surestimation de la quantité de cholestérol libre dans les échantillons, le  $FER_{HDL}$  déterminé par la méthode LC-MS est similaire à celui de la mesure enzymatique. Notre méthode LC-MS semble donc appropriée pour mesurer les changements causés par l'action de la LCAT. De plus, le calcul du  $FER_{HDL}$  (et de changement d'abondance pour les autres lipides) peut s'effectuer avec des mesures semi-quantitatives, ce qui permet de contourner notre problème de courbe de calibration du cholestérol.

**Tableau VI. Comparaison du dosage du cholestérol libre entre la méthode enzymatique et la méthode LC-MS. N.= 5 expériences en triplicata.**

|  | Méthode enzymatique |       | Méthode LC-MS |       |
|--|---------------------|-------|---------------|-------|
|  | 4°C                 | 37°C  | 4°C           | 37°C  |
| Cholestérol libre ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 86,14               | 56,21 | 146,00        | 93,10 |
| ET                                     | 5.9                 | 4.3   | 23,1          | 11,9  |
| CV                                     | 6.9%                | 7.7%  | 15.8%         | 12.8% |
| $FER_{HDL}$                            | 17.4%               |       | 18.1%         |       |

Puisque la méthode enzymatique ne mesure que le cholestérol libre, nous n'avons mesuré quantitativement que celui-ci avec la méthode LC-MS. Tous les autres lipides ont été mesurés de façon semi-quantitative en évaluant les différences d'abondances de ceux-ci entre les plasmas incubés à 37°C et à 4°C. Nous avons analysé les échantillons de façon non ciblée. Tous les lipides détectés par la MS (480 entités) sont illustrés à la Figure 15 par un graphique de type volcano, ce qui permet d'identifier les entités ou signaux lipidiques les plus modifiés suite à l'incubation du plasma déplété.



**Figure 15. Graphique de type volcano illustrant les changements d'abondance des entités ou signaux lipidiques suite à l'incubation du plasma.** Les lipides statistiquement modifiés par l'incubation sont en rouge ( $FC \geq 1,2$  et  $p \text{ corrigée} \leq 0,05$ ) et l'identité des lipides identifiés est présentée au Tableau VI.

En établissant la valeur limite d'amplitude des changements d'abondance (fold change, FC) à  $\geq 1,2$  (donc 1,2 fois plus ou 1,2 fois moins après l'incubation) et le seuil de significativité statistique (valeur p corrigée pour FDR 5%) à  $\leq 0,05$ , nous avons isolé 45 entités lipidiques. Après avoir manuellement vérifié chacune des entités pour éliminer les signaux pouvant être attribués à des doublons ou des fragments, ainsi que ceux qui n'ont pas pu être identifiés à l'aide des bases de données, ce nombre a été diminué à 16 lipides identifiés et confirmés par MS/MS, sauf pour la LPC20:2 (Tableau VII). L'on remarque rapidement que sauf le DG, tous ces lipides sont des substrats ou des produits potentiels de la LCAT, avec une forte présence des LPC, qui représentaient 9 des 16 lipides identifiés.

**Tableau VII. Espèces lipidiques modifiées en abondance par l'incubation du plasma déplété à 37°C pendant 2 heures.** La valeur limite pour l'amplitude du changement d'abondance était de  $\geq 1,2$  (1,2x plus ou 1,2x moins) et la significativité statistique a été établie à  $p \leq 0,05$  (FDR 5%) (N=5). Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio de l'abondance à 37°C sur l'abondance à 4°C. \*Le LPC(20:2) n'a pas pu être confirmé en MS/MS.

|                                       | Ratio 37°C/4°C | Valeur de p corrigée |
|---------------------------------------|----------------|----------------------|
| <b>Cholestérol</b>                    |                |                      |
| Cholestérol libre                     | 0,57           | 7,17E-17             |
| <b>Lysophosphatidylcholines (LPC)</b> |                |                      |
| LPC(18:1)                             | 1,51           | 9,08E-04             |
| LPC(18:0)                             | 1,49           | 8,98E-14             |
| LPC(16:0)                             | 1,41           | 1,42E-08             |
| LPC(16:1)                             | 1,37           | 2,63E-05             |
| LPC(17:0)                             | 1,32           | 2,08E-05             |
| LPC(14:0)                             | 1,31           | 1,02E-05             |
| LPC(20:2)*                            | 1,26           | 8,07E-05             |
| <b>Lysoplasmalogènes (LPC O-)</b>     |                |                      |
| LPC(O-18:1)                           | 1,40           | 1,18E-12             |
| LPC(O-18:0)                           | 1,38           | 3,48E-07             |
| <b>Phosphatidylcholines (PC)</b>      |                |                      |
| PC(34:3)                              | 0,40           | 7,26E-05             |
| PC(16:0/16:1)                         | 0,68           | 6,90E-21             |
| PC(14:0/16:0)                         | 0,68           | 5,53E-18             |
| PC(33:1)                              | 0,76           | 3,21E-09             |
| PC(14:0/18:2)                         | 0,78           | 4,93E-14             |
| <b>Diacylglycérols (DG)</b>           |                |                      |
| DG(16:0/18:1)                         | 1,75           | 7,13E-22             |

Il peut sembler étonnant que les esters de cholestérol soient absents du Tableau VII, alors que l'on retrouve le cholestérol libre, avec une abondance à 37°C diminuée de 43% ( $p=7,17E-17$ ) après les 2 heures d'incubation. Toutefois, le choix d'un FC  $\geq 1,2$  a été fait afin d'identifier seulement les lipides les plus modifiés par l'incubation. En enlevant cette contrainte, l'on peut identifier deux CE modifiés très faiblement par l'incubation : le CE(20:3) (FC= 1,08,  $p=7,06E-6$ ) et le CE(20:5) (FC= 1,08,  $p=2,91E-7$ ). Finalement, 5 des 16 entités sont des PC, mais ce ne sont pas les PC les plus abondantes sur les HDL du plasma (19). Cette situation n'est pas particulièrement étonnante, car les CE et les PC sont les lipides les plus abondants dans les HDL (19), il faut donc une augmentation d'abondance plus importante relative à leur abondance naturelle pour que cette augmentation soit détectable. Détecter

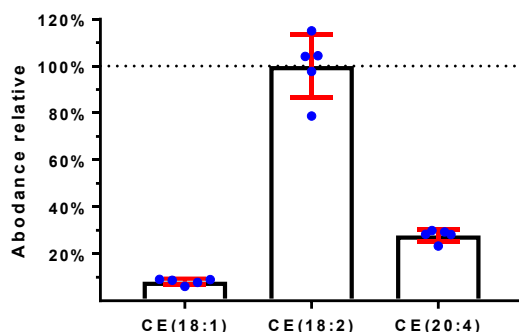
des petits changements d'abondance est difficile et alors qu'il n'existe que quelques combinaisons possibles d'acides gras en position sn-1 sur les phospholipides (principalement 16:0, 18:0 et 18:1), il peut y avoir une très grande quantité d'acides gras différents en sn-2. L'action de la LCAT (qui hydrolyse principalement l'acide gras en sn-2) ne forme donc que quelques LPC, mais consomme beaucoup de PC différentes et de ce fait, produit beaucoup de CE différents. C'est exactement ce que l'on observe avec la LC-MS. Les 3 LPC ayant l'augmentation d'abondance la plus importante étaient les LPC(18:1), LPC(18:0) et LPC(16:0), augmentées respectivement de 51%, 49% et 41% suivant l'incubation. Elles ont le potentiel d'être de bons marqueurs de l'activité LCAT, car elles ont l'avantage d'être peu abondantes et d'être produites par plusieurs PC différentes, ce qui augmente davantage leur abondance suivant l'incubation. L'on retrouve ensuite des lysoplasmalogènes et des LPC dérivant de PC naturellement moins abondantes, donc moins susceptibles d'être des substrats de la LCAT. Au niveau des espèces diminuées en abondance par l'incubation, l'on retrouve bien sûr le cholestérol libre, dont 43% a été estérifié après deux heures, ce qui nous donne un  $FER_{HDL}$  d'environ 21,5% par heure. Des 4 phospholipides identifiés, la PC(34:3) était la plus modifiée par l'incubation; il n'en restait que 40% de la concentration initiale, soit 2,5 fois moins. Malheureusement, il n'a pas été possible d'identifier complètement cette PC en MS/MS car les fragments n'étaient pas assez abondants. Seul le groupement polaire choline a pu être identifié avec certitude, ce pourrait donc être n'importe quelle combinaison de PC ayant 34 carbones et 3 doubles liens (par exemple, 16:1/18:2).

En conclusion, les lipides les plus affectés par l'action de la LCAT semblent être le cholestérol libre et les LPC, particulièrement les LPC(16:0) et LPC(18:0), qui sont les LPC dérivant des PC les plus abondantes sur les HDL. La PC(34:3) semble aussi prometteuse, puisque c'est la PC la plus modifiée par l'action de la LCAT. Ces lipides sont donc tous des marqueurs potentiels de l'action de la LCAT dans le plasma déplété en lipoprotéines à apoB.



### 3.2.1 Utilisation d'isotopes stables de cholestérol pour estimer la synthèse des CE par la LCAT

Il existe un moyen de contourner le problème de l'absence de changement chez les esters de cholestérol causé par leur surabondance: l'utilisation d'isotopes stables. Puisque les esters de cholestérol sont formés par l'action de la LCAT sur le cholestérol, des échantillons de plasma (N=5 expériences en triplicata) ont été chargés avec du cholestérol deutéré (d7-cholestérol, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Une quantité de d7-cholestérol représentant environ 10% du cholestérol libre endogène (afin de ne pas trop modifier le profil en CL des HDL) a été ajouté aux plasmas déplétés et les échantillons ont été traités comme à l'habitude. Par la suite, la version deutérée des esters de cholestérol a été recherchée manuellement dans le patron LC-MS en additionnant au m/z des CE la masse supplémentaire apportée par les molécules de deutérium afin de vérifier quels esters étaient les plus produits par la LCAT (Figure 16).



**Figure 16. Abondance des esters de cholestérol deutérés détectables en LC-MS après l'ajout de d7-cholestérol au plasma avant l'incubation.** L'abondance des esters a été extraite manuellement avec la suite de logiciels Mass Hunter et corrigée par l'abondance du standard externe PC(14:0/14:0) (N=5 expériences en triplicata). Moyenne  $\pm$  ET.

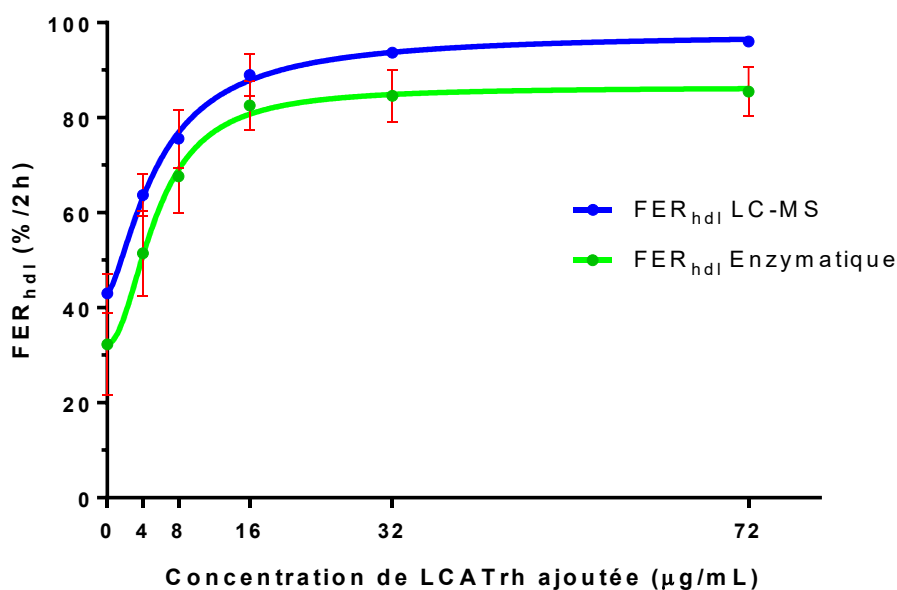
À cause de la faible quantité de d7-cholestérol utilisé, seulement 3 esters de cholestérol deutéré avaient une abondance assez importante pour créer signal mesurable : les CE(18:1), CE(18:2) et CE(20:4). De ces CE, le CE(18:2) était le plus abondant, l'abondance des CE(20:4) et CE(18:1) étant respectivement 28% et 8% de l'abondance du CE(18:2). Ces résultats impliquent que les PC ayant un acide gras de type 18:2 en position sn-2 sont les plus utilisées par la LCAT, ce qui est conforme à ce que la littérature indique (62), mais aussi à leur abondance importante dans les HDL (19, 97). Cette abondance favorise probablement leur utilisation par la LCAT, les molécules plus abondantes ayant plus de chance de se retrouver au site de liaison de la LCAT sur les HDL. Il aurait peut-être été possible de saturer le plasma avec du d7-cholestérol pour provoquer la formation de plus d'ester deutérés, mais avec ce genre d'expérience nous n'aurions pas mesuré l'activité LCAT en condition normale. L'apport de beaucoup de cholestérol libre aurait pu modifier le comportement de l'enzyme.

### **3.2.2 Effet de la LCAT recombinante humaine sur le plasma**

Notre méthodologie permet de bien détecter les changements lipidiques causés par l'incubation du plasma. Toutefois, il existe un certain doute sur l'acteur de ces changements. En effet, bien que la littérature ne rapporte pas la présence de phospholipases plasmatiques aussi abondantes que la LCAT, il est possible qu'une autre protéine plasmatique ou que la combinaison de plusieurs phospholipases soit aussi capable de modifier l'abondance des lipides présents dans les HDL. Parmi les phospholipases potentielles, l'on peut penser aux phospholipases A2 sécrétées de type II (sPLA<sub>2</sub>-II), qui sont habituellement impliquées dans la défense immunitaire contre les pathogènes, ou encore à la famille des lipases plasmatiques : LPL, HL et EL. La EL en particulier est fortement impliquée dans le remodelage des HDL (98). Toutefois, aucune de ces phospholipases sécrétées n'est capable d'effectuer la fonction acyltransférase de la LCAT, la génération de CE et la consommation de CL sont donc propre à l'activité LCAT. Puisqu'il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques de la LCAT, nous avons décidé d'ajouter plusieurs concentrations de LCATrh au plasma afin de créer des courbes dose-réponse des changements lipidiques. De cette façon, il est possible d'observer les changements causés exclusivement par l'action de la LCAT.

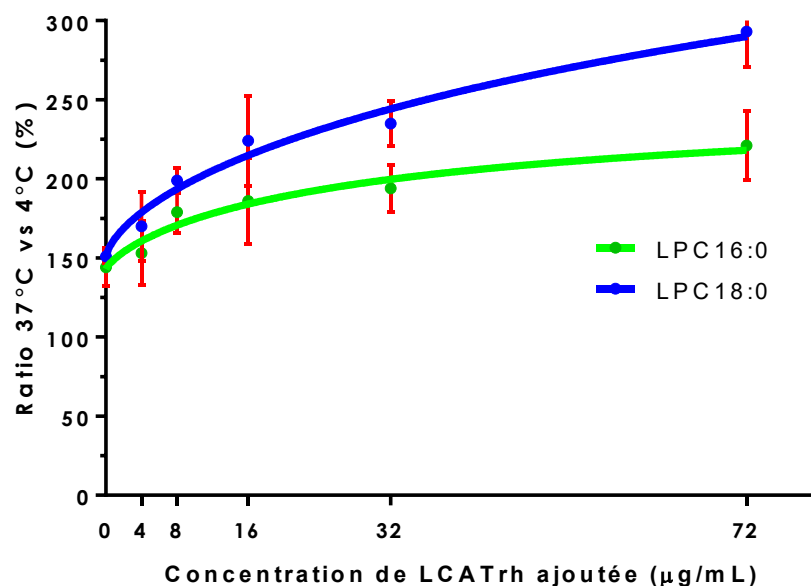
Six doses de LCATrh (0, 4, 8, 16, 32 et 72 µg/mL) ont été ajoutées aux échantillons de plasma (N=3 expériences, sauf dose maximale, N=2; tous en monoplicat) avant l'incubation et les échantillons ont été traités et analysés selon le protocole standard. L'analyse du changement d'abondance des signaux des entités lipidiques à chacune des concentrations de LCATrh (300 à 340 entités selon les concentrations de LCATrh) a permis de déterminer quels lipides étaient modifiés par la LCATrh dans ces échantillons, et seuls les lipides présentant une modification statistiquement significative ( $p \leq 0,05$ , FDR 5%) et un FC  $\geq 1,2$  pour au moins 4 des 6 concentrations ont été conservés pour l'analyse des courbes de dose réponse. Cette première sélection a permis d'isoler 16 entités. Ces 16 entités ont été vérifiées manuellement afin d'éliminer les signaux identifiés pouvant être attribués à des doublons ou des fragments, ainsi que ceux qui n'ont pas pu être identifiés à l'aide des bases de données, ce qui a permis de réduire ce nombre à 8 lipides identifiés et validés en MS/MS : le CL; les LPC(16:0) et LPC(18:0); les PC(O-32:0), PC(14:0|18:2), PC(16:0/16:1) et PC(16:0/18:0) et le DG(16:0/18:1).

Comme pour les analyses précédentes, en plus d'être analysé en LC-MS, le cholestérol libre a été dosé par méthode enzymatique, et les deux méthodes d'analyses ont été comparées (Figure 17). L'on remarque que de façon similaire à l'expérience précédente, il y a un biais entre les méthodes, et à chacune des concentrations de LCATrh ajoutées, la méthode LC-MS mesurait un FER<sub>HDL</sub> plus élevé. En moyenne, le FER<sub>HDL</sub> était 17% plus élevé avec la méthode LC-MS, ce qui concorde avec les résultats obtenus sans LCATrh (Tableau VII). L'estérification du cholestérol est très dépendante de la dose de LCATrh ajouté, et cette estérification atteignait un plateau à partir de la dose de 16 µg/mL, probablement à cause de l'épuisement du substrat accessible, 80% à 90% de celui-ci étant estérifié à cette concentration.



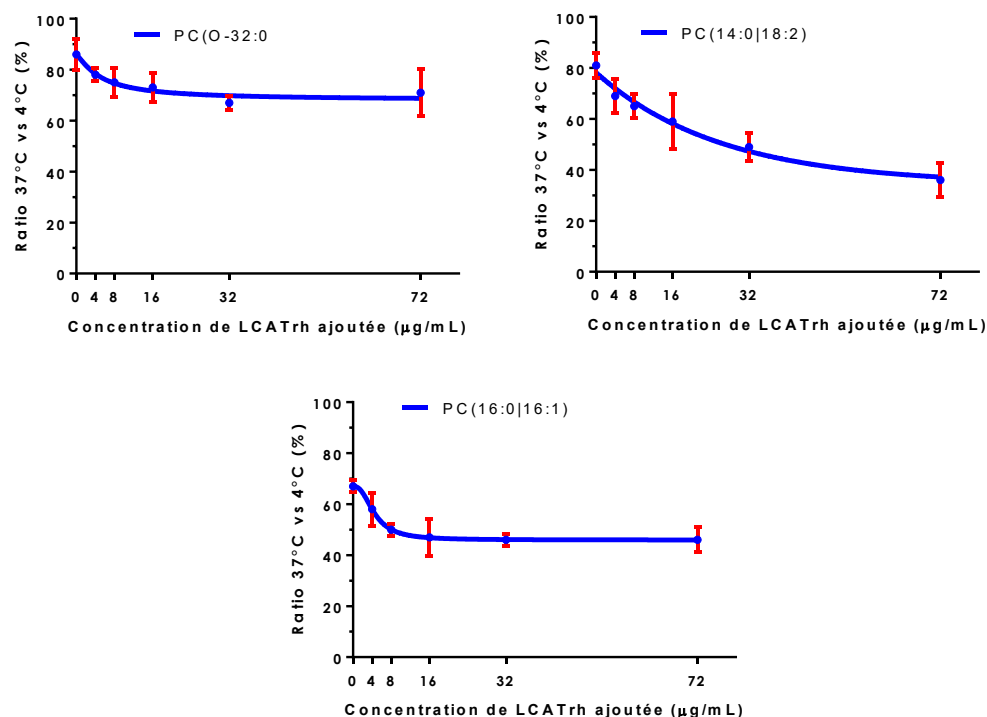
**Figure 17. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur le FER<sub>HDL</sub> entre la méthode de mesure enzymatique et LC-MS.** La LCATrh a été ajoutée au plasma déplété avant l'incubation. N=3 expériences en monoplicat (sauf concentration 72 ug/mL, N=2). Moyennes  $\pm$  ET (certaines barres d'erreur sont cachées par les points).

Les LPC(16:0) et LPC(18:0) ont bien répondu à l'ajout de LCATrh (Figure 18). L'abondance de la LPC(16:0) après l'incubation, à la dose de 72 µg/mL, était augmentée de 120% par rapport à la mesure à 4°C, tandis que l'abondance du LPC(18:0) était augmentée de 193%. À la dose plus physiologique de 8 ug/mL (qui est similaire à la concentration moyenne en LCAT dans le plasma (42)), l'abondance du LPC(16:0) était augmentée de 78% et celle du LPC(18:0) de 99%. Ces résultats confirment leur potentiel comme biomarqueur de l'activité LCAT.



**Figure 18. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance des LPC(16:0) et LPC(18:0).** La LCATrh a été ajoutée au plasma déplété avant l'incubation. N=3 expériences en monoplicat (sauf concentration 72 ug/mL, N=2). Moyennes  $\pm$  ET.

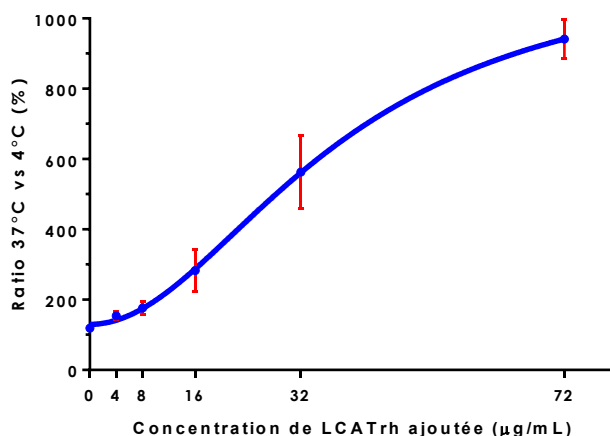
Les autres lipides étaient tous diminués par l'incubation et comme pour l'expérience sans ajout de LCATrh, l'on n'a pas réussi à mesurer des changements chez les CE. Au niveau des PC, quelques espèces plus rares ont été détectées (Figure 19). Les PC réagissaient généralement de la même façon, mais pas tous avec la même amplitude : La PC(14:0/18:2) avait subi une diminution d'abondance fortement dépendante de la concentration en LCATrh, atteignant à la dose la plus forte une diminution de 64% de son abondance et tendait à attendre un plateau de l'effet. Les PC(O-32:0) (un plasmalogène) et PC(16:0/16:1) atteignaient rapidement un plateau de l'effet à la dose de 8  $\mu$ g/mL, avec une diminution maximale de l'abondance de 30% et 54% respectivement.



**Figure 19. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance des PC(O-32:0), PC(14:0/18:2) et PC(16:0/16:1).** La LCATrh a été ajoutée au plasma déplété avant l'incubation. N=3 expériences en monoplicat (sauf concentration 72 ug/mL, N=2). Moyennes  $\pm$  ET.

Une PC a cependant réagi de façon très inattendue. Il s'agissait de la PC(16:0/18:0), qui au lieu de voir son abondance diminuée par l'incubation, a plutôt vu celle-ci augmentée de façon spectaculaire (Figure 20). À la dose maximale de LCATrh son abondance était augmentée de 841%, ce qui, couplé à son abondance plutôt faible à 4°C (2,5E+5, alors qu'une PC abondante comme la PC(16:0/18:2) présente une abondance à 4°C de 6,1E+7, soit 100 fois supérieur), suggère que cette PC n'était pas très abondante au départ. Cette PC réagissait donc dans le sens contraire de ce qui était attendu et de façon très importante. Toutefois, la PC(16:0/18:0) est particulière, car elle est formée par les deux acides gras les plus abondants chez les LPC. De plus, son abondance augmentait plus rapidement à partir de la dose 8 µg/mL et commençait à plafonner à la dose la plus élevée de LCATrh. Ces

informations nous ont permis d'émettre une hypothèse sur son comportement : Cette PC est probablement formée par une réaction de réacylation des LPC présentes dans le plasma par la LCAT. Cette réacylation des LPC explique peut-être pourquoi l'augmentation de l'abondance des LPC(16:0) et LPC(18:0) semblait plafonner aux concentrations de LCATrh plus élevées.



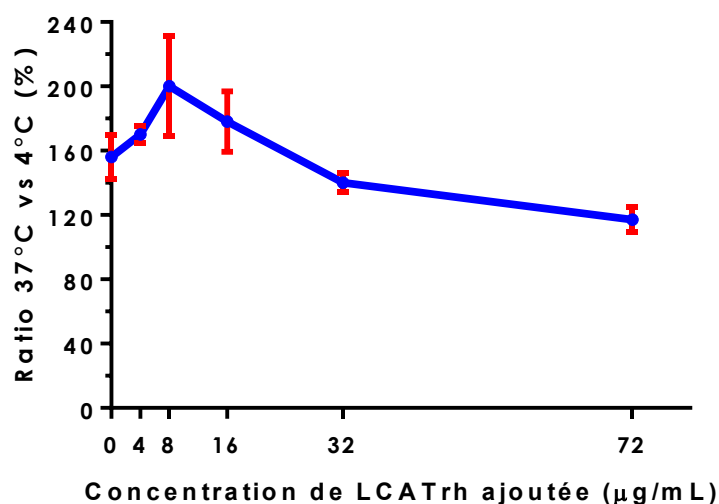
**Figure 20. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance du PC(16:0/18:0).** La LCATrh a été ajoutée au plasma déplété avant l'incubation. N=3 expériences en monoplicat (sauf concentration 72 ug/mL, N=2). Moyennes  $\pm$  ET.

En effet, il est connu que la LCAT est capable d'effectuer un cycle d'acylation/réacylation des PC lorsque ses substrats ne sont pas disponibles (67, 99). Certains éléments de la dose-réponse viennent aussi renforcer cette idée : l'abondance de la PC(16:0/18:0) augmentait plus rapidement à partir de la dose de 8 µg/mL; or c'est à cette dose que l'activité  $FER_{HDL}$  de la LCAT commençait à plafonner par manque de substrat. De plus, aux doses les plus élevées de LCATrh, l'augmentation de l'abondance des LPC(16:0) et LPC(18:0) atteignait un plateau. Il est donc probable que, dans le milieu de réaction « fermé » de cette expérience, la quantité de CL limitée et la présence d'une concentration plus importante de LPC aient favorisé l'activité secondaire de réacylation des LPC de la LCAT, ce qui aurait eu pour conséquence d'augmenter la concentration plasmatique de la

PC(16:0/18:0), une PC qui est normalement rare sur les HDL. Cette réaction est probablement rare *in vivo*, car elle est en compétition avec l'estérification du cholestérol libre, qui n'est pas limitant aux concentrations normales de LCAT plasmatique. De plus les LPC créées par l'action de la LCAT sont diffusées dans le plasma et incorporées à l'albumine lorsque leur concentration sur les HDL devient trop importante. Comme la LCAT nécessite la présence d'un cofacteur pour réacyler les LPC (59), les LPC incorporées à l'albumine ne sont probablement pas utilisées par la LCAT. Dans notre système, une partie des LPC produites ont probablement migrées sur l'albumine, mais sans renouvellement de celle-ci, il est peu probable que tous les LPC aient quitté les HDL.

La dernière espèce lipidique identifiée lors de cette expérience était le DG(16:0/18:1), qu'on retrouvait aussi dans l'expérience sans LCATrh. Comme les DG ne sont pas normalement des substrats de la LCAT, l'on se demandait si cette augmentation était dépendante de la LCAT. La courbe dose-réponse a permis de déterminer que ce n'était pas le cas, puisque les changements d'abondance du DG ne dépendaient pas de la concentration de LCATrh ajoutée (Figure 21). Malheureusement il n'a pas été possible d'en déterminer la source, mais il est possible qu'une autre protéine plasmatique soit responsable de l'augmentation de son abondance. Par exemple, la HL et la LPL sont des lipases plasmatiques avec une affinité pour les triglycérides et il est possible qu'elles se retrouvent dans le plasma déplété et soient responsables de l'augmentation d'abondance du DG(16:0/18:1) par hydrolyse de TG.





**Figure 21. Dose-réponse de l'enrichissement en LCATrh sur l'abondance du DG(16:0/18:1).** La LCATrh a été ajoutée au plasma déplété avant l'incubation. N=3 expériences en monoplicat (sauf concentration 72 ug/mL, N=2). Moyennes  $\pm$  ET.

La réalisation d'une courbe dose-réponse de LCATrh a donc permis de confirmer que les changements observés lors de la première expérience étaient bel et bien dus, pour la majorité, à l'action de la LCAT. De plus, à la vue des résultats que nous avons obtenus, il semblerait que la dose de 8 µg/mL soit celle qui produit les changements les plus intéressants au niveau du profil lipidique des échantillons de plasma déplété. À cette dose l'effet sur les lipides étudiés est important, mais n'a pas encore atteint son plateau, sauf pour les PC(16:0/16:1) et PC(O-32:0). De plus, cette dose est similaire à la concentration naturelle de la LCAT chez l'homme (environ 8 µg/mL (42)), ce qui en fait une dose thérapeutique intéressante dans l'optique d'un traitement à la LCAT recombinante chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires athérosclérotiques ou déficients en LCAT.

### 3.3 Activité LCAT dans la cohorte Biobanque ICM

La dernière étape du projet consistait à analyser l'activité de la LCAT dans une cohorte cas-témoin de patients de la Biobanque de l'ICM. Les cas sont des donneurs ayant eu un évènement coronarien (Infarctus du myocarde) ou une procédure de revascularisation (ICP/CABG) alors que les témoins sont des patients de l'ICM n'ayant eu aucun évènement clinique (IM, CABG, angioplastie, angine, etc.). Les échantillons ont été obtenus à partir de la sélection obtenue pour le projet de fonction des HDL de la Biobanque de l'ICM (n=5500 sujets) et ont été traités de la même façon que le plasma groupé. Les données démographiques et biochimiques de la cohorte sont présentées au Tableau VIII et IX respectivement.

**Tableau VIII. Données démographiques de la cohorte Biobanque ICM.** Les données catégorielles sont en N. (%), leurs valeurs p sont déterminées par des tests exacts de Fisher. Les données numériques sont en Moy (ET), leurs valeurs p sont déterminées par des tests de t de Student.

| Démographie            | Témoins (n=50) | Cas (n=50) | Valeur p |
|------------------------|----------------|------------|----------|
| Age, années            | 57 (13)        | 69 (7)     | <0,0001  |
| Hommes                 | 18 (36)        | 34 (68)    | 0,0025   |
| Femmes                 | 32 (64)        | 16 (32)    |          |
| IMC, kg/m <sup>2</sup> | 27,1 (5,7)     | 28,2 (4,9) | ns       |
| Dyslipidémie           | 5 (10)         | 46 (92)    | <0,0001  |
| Hypertension           | 11 (22)        | 38 (76)    | <0,0001  |
| Diabète                | 1 (2)          | 18 (36)    | <0,0001  |
| Prise de statines      | 6 (12)         | 49 (98)    | <0,0001  |

En comparaison avec le groupe cas, le groupe témoin était plus jeune, composé de plus de femmes que d'hommes et était globalement plus en santé (moins de facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire, tels que diabète, hypertension et dyslipidémie), ce qui est typique d'un groupe témoin. Le groupe témoin avait une glycémie et une créatinine moins élevée et une plus grande concentration de cholestérol sanguin que les cas, autant au niveau des LDL que du cholestérol total. Ce résultat n'est pas étonnant, car 98% des cas étaient traités avec une des statines (en majorité de l'atorvastatine ou de la rosuvastatine),

contre 12 % pour les témoins, et les statines ont pour effet de diminuer le LDL-C et le cholestérol total. Les contrôles avaient aussi plus d'apoA-I, d'apoB et de HDL-C, en concordance avec la concentration plus élevée de cholestérol dans ces lipoprotéines, ce qui suggère la présence d'un nombre plus élevé de lipoprotéines plutôt que des lipoprotéines plus grosses. Finalement, il n'y avait pas de différence entre les groupes au niveau des TG, du  $\log_{10}$  de la protéine C réactive (hsCRP), de l'efflux de cholestérol basal des J774 et du  $FER_{HDL}$ .

**Tableau IX. Données biochimiques de la cohorte Biobanque ICM.** Les données sont sous forme moyenne (ET). Les valeurs p sont déterminées par des tests de t de Student, avec un seuil de 0,05.

| Biochimie             | Témoins<br>(n=50) | Cas<br>(n=50) | Valeur p |
|-----------------------|-------------------|---------------|----------|
| Cholestérol total, mM | 4,76 (0,87)       | 3,58 (0,72)   | <0,0001  |
| LDL-C, mM             | 2,59 (0,76)       | 1,85 (0,52)   | <0,0001  |
| HDL-C total, mM       | 1,42 (0,47)       | 1,24 (0,31)   | 0,025    |
| TG, mM                | 1,79 (1,12)       | 1,93 (0,83)   | ns       |
| apoA-I, mM            | 1,66 (0,30)       | 1,51 (0,25)   | 0,007    |
| apoB, mM              | 0,91 (0,18)       | 0,71 (0,17)   | <0,0001  |
| Créatinine, $\mu$ M   | 72,46 (13,01)     | 94,48 (42,23) | 0,0006   |
| hsCRP, mg/L           | 1,94 (2,24)       | 3,01 (3,73)   | ns       |
| Glucose, mM           | 5,50 (1,24)       | 6,97 (2,83)   | 0,001    |
| Efflux J774 Basal     | 2,26 (0,32)       | 2,20 (0,26)   | ns       |

### 3.3.1 Mesures enzymatiques

Le dosage du cholestérol libre avec la méthode enzymatique a permis de souligner des différences dans l'activité LCAT entre les groupes (Tableau X). Les HDL des témoins contenaient plus de cholestérol libre que celles des cas (376  $\mu$ mol/L contre 300  $\mu$ mol/L) et l'activité LCAT était plus importante chez les témoins. Bien que la différence de  $FER_{HDL}$  n'était pas statistiquement différente (Ctl= 20,5 %/h et Cas= 17,7 %/h;  $p=0,0578$ ), lorsque l'on regardait l'activité LCAT en terme de quantité cholestérol estérifié (en mole, MER), cette différence devenait significative (72,1 contre 51,5  $\mu$ mol/L/h,  $p<0,0001$ ). La LCAT du groupe témoin était donc plus efficace pour estérifier le cholestérol, probablement car les témoins

avaient un meilleur profil HDL (tel que suggéré par la quantité plus importante d'apoA-I chez les témoins), ce qui a une forte influence sur l'activité endogène de la LCAT.

**Tableau X. Paramètres en lien avec l'activité LCAT par mesure enzymatique dans la cohorte Biobanque ICM.** N=45 pour les témoins et N=49 pour les cas (certains échantillons n'étaient pas assez abondants pour être analysés en LC-MS et en enzymatique). Les valeurs p sont déterminées par des tests de *t* de Student avec un seuil de 0,05.

|                                       | Cholestérol libre (μmol/L) |       |       | FER <sub>HDL</sub> (%/h) |     |       | MER (μmol/L/h) |      |       |
|---------------------------------------|----------------------------|-------|-------|--------------------------|-----|-------|----------------|------|-------|
|                                       | Moyenne                    | SD    | CV    | Moyenne                  | SD  | CV    | Moyenne        | SD   | CV    |
| Témoins                               | 375,5                      | 114,8 | 30,6% | 20,5                     | 7,0 | 34,3% | 72,1           | 21,8 | 30,2% |
| Cas                                   | 299,6                      | 63,8  | 21,3% | 17,7                     | 7,2 | 40,5% | 51,5           | 20,3 | 39,5% |
| Valeur p de la différence Cas/Témoins | 0.0001                     |       |       | NS (0,0578)              |     |       | ≤0.0001        |      |       |
| Ratio Cas/Témoins                     | 0,80                       |       |       | 0,86                     |     |       | 0,71           |      |       |

Toutefois, il est apparu pendant l'analyse des données démographiques (Tableau VII) que la sélection des cas et témoins n'ayant pas été balancée pour le sexe, le ratio homme/femme était inversé entre les témoins et les cas avec maladie coronarienne athérosclérotique. Comme les hommes et les femmes ont des profils lipidiques différents, l'on peut se demander si la proportion plus importante de femmes dans la cohorte témoin a pu avoir un effet sur les mesures d'activité de la LCAT. En séparant la mesure du cholestérol libre entre les hommes et les femmes de chacun des groupes (Tableau XI), l'on remarque que la différence observée dans le Tableau X était principalement attribuable aux femmes (ctl= 423,6 ± 102,6 μmol/L vs cas= 349,5 ± 61,1 μmol/L, p=0,0135), les hommes ne présentant pas de différences entre les témoins et les cas (279,4 ± 69,1 μmol/L vs 277,7 ± 69,1 μmol/L). Comme les femmes sont plus nombreuses dans le groupe témoin, leur mesure a plus de poids, ce qui explique la différence significative observée entre les groupes dans la mesure du HDL-CL. Cependant, cette tendance s'inversait lorsque l'on regardait l'activité de la LCAT. Le FER<sub>HDL</sub> des femmes était similaire entre les cohortes (18,2 ± 6,7 %/h vs 16,2 ± 7,4 %/h),

tandis que chez les hommes, les témoins avaient un FER<sub>HDL</sub> beaucoup plus important que les cas ( $25,1 \pm 5,3$  %/h vs  $18,4 \pm 7,1$  %/h,  $p=0.0103$ ). Les valeurs de MER n'ont pas été très affectées par le mauvais balancement. Il n'existe pas de différence significative entre le MER des hommes et des femmes autant chez les cas que chez le groupe témoin. Toutefois, les témoins avaient un MER plus élevé que les cas, autant chez les hommes ( $68,5 \pm 14,7$   $\mu\text{mol/L}$  vs  $49,8 \pm 17,9$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,0175$ ) que chez les femmes ( $74,0 \pm 24,6$   $\mu\text{mol/L}$  vs  $55,4 \pm 25,3$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,0324$ ), bien que la tendance soit un peu moins forte chez les femmes.

**Tableau XI. Paramètres en lien avec l'activité LCAT dans la cohorte Biobanque ICM, séparé par sexe et par groupe (témoins et cas).** Les valeurs p sont déterminées par anova à 2 facteurs avec des tests de comparaison multiples de Tukey, seuil de 0,05.

|                                  | Témoins           |                  |             | Cas               |                  |             |
|----------------------------------|-------------------|------------------|-------------|-------------------|------------------|-------------|
|                                  | Hommes<br>(N=15)  | Femmes<br>(N=30) | Valeur<br>p | Hommes<br>(N=34)  | Femmes<br>(N=15) | Valeur<br>P |
| HDL-CL, $\mu\text{M}$<br>(SD)    | 279,4 (69,1)      | 423,6 (102,6)    | <0,0001     | 277,7 (52,1)      | 349,5 (61,1)     | <0,0150     |
| FER <sub>HDL</sub> , %/h<br>(SD) | 25,1 (5,3)        | 18,2 (6,7)       | 0.0094      | 18,4 (7,1)        | 16,2 (7,4)       | ns          |
| MER, $\mu\text{M}$ (SD)          | 68,5 (14,7)       | 74,0 (24,6)      | ns          | 49,8 (17,9)       | 55,4 (25,3)      | ns          |
|                                  | Hommes            |                  |             | Femmes            |                  |             |
|                                  | Témoins<br>(N=15) | Cas<br>(N=34)    | Valeur<br>p | Témoins<br>(N=30) | Cas<br>(N=15)    | Valeur<br>p |
| HDL-CL, $\mu\text{M}$<br>(SD)    | 279,4 (69,1)      | 277,7 (52,1)     | ns          | 423,6 (102,6)     | 349,5 (61,1)     | 0.0135      |
| FER <sub>HDL</sub> , %/h<br>(SD) | 25,1 (5,3)        | 18,4 (7,1)       | 0.0103      | 18,2 (6,7)        | 16,2 (7,4)       | ns          |
| MER, $\mu\text{M}$ (SD)          | 68,5 (14,7)       | 49,8 (17,9)      | 0,0175      | 74,0 (24,6)       | 55,4 (25,3)      | 0,0324      |

Comme les hommes sont moins nombreux dans la cohorte témoin, la différence de FER<sub>HDL</sub> entre les groupes a été minimisée au point de ne plus être significative. Le cholestérol libre et le MER n'ont toutefois pas été trop affectés. Une cohorte mieux balancée pour les sexes aurait donc probablement montré une différence significative entre les groupes au niveau du FER<sub>HDL</sub>, mais pas d'autres changements importants pour les mesures en lien avec la LCAT. Pour les autres mesures des Tableaux VIII et IX, il y a peu de différences entre les sexes

(résultats non montrés), les résultats n'auraient donc pas non plus été très différents dans une cohorte mieux balancée.

### 3.3.2 Mesures LC-MS

#### 3.3.2.1 Comparaisons entre la mesure enzymatique et la mesure LC-MS

Comme pour le plasma groupé, les mesures de  $FER_{HDL}$  obtenues avec la LC-MS ont été comparées à celles obtenues avec la méthode enzymatique afin de valider les résultats LC-MS dans la cohorte Biobanque ICM (Tableau XII). Le Tableau XII permet de mettre en évidence des différences entre les méthodes de mesure. Tout d'abord, les mesures de  $FER_{HDL}$  déterminées par la méthode LC-MS ne sont pas significativement différentes entre les groupes témoins et cas, alors qu'elles le sont avec la méthode enzymatique. Ensuite, le  $FER_{HDL}$  est significativement différent entre les témoins selon les méthodes de mesure, mais pas celui des cas.

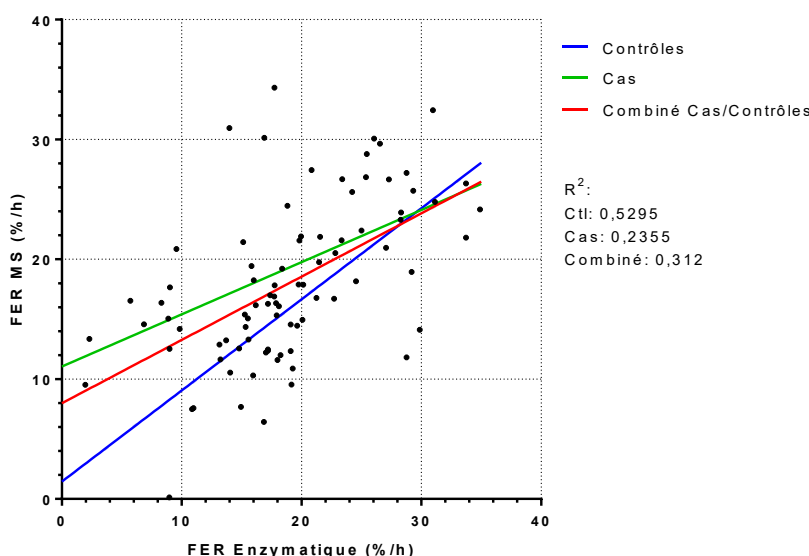
**Tableau XII. Comparaison du  $FER_{HDL}$  entre les groupes de la cohorte Biobanque ICM séparés entre la méthode enzymatique et la méthode LC-MS.** Les mesures présentées sont appariées entre les méthodes, chaque groupe contient donc le même nombre d'échantillons entre les méthodes de mesure. Les valeurs p sont déterminées par des tests de *t* de Student, avec un seuil de 0,05.

| $FER_{HDL}$ , %, (SD) | Témoins (N=39) | Cas (N=46)  | Valeur p    |
|-----------------------|----------------|-------------|-------------|
| Enzymatique           | 20,8 (6,9)     | 17,5 (6,9)  | 0,0308      |
| LC-MS                 | 17,3 (7,2)     | 18,7 (6,2)  | NS (0,3382) |
| Valeur p              | 0,0315         | NS (0,3826) |             |

De plus, contrairement aux résultats avec le plasma groupé, où le  $FER_{HDL}$  était plus élevé lorsque mesuré par méthode LC-MS, il est plus bas lorsque mesuré par LC-MS dans la cohorte Biobanque ICM. Toutefois, la différence la plus importante entre les méthodes de mesure est la présence de valeurs de  $FER_{HDL}$  négatives avec la méthode LC-MS. En effet, le groupe témoin avait 5 donneurs avec un  $FER_{HDL}$  négatif tandis que le groupe cas en avait 2.

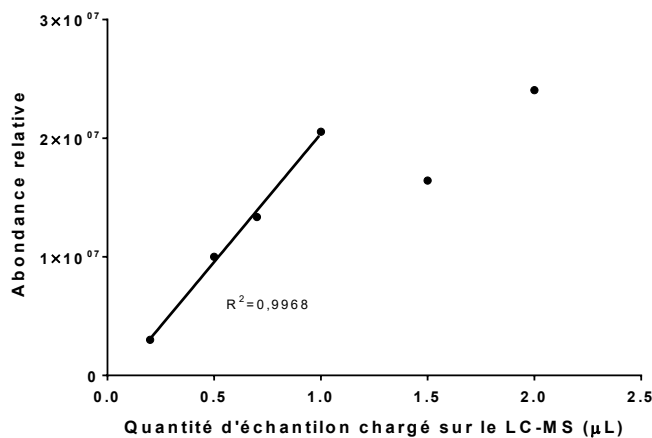
Ces valeurs négatives n'ont pas été utilisées dans les comparaisons du Tableau XII, ce qui, combiné aux échantillons qui n'ont pas pu être mesurés avec la méthode enzymatique, explique les N. très différents entre les groupes.

La présence de valeurs de  $FER_{HDL}$  négatives ainsi que les différences entre les méthodes de mesure semblaient indiquer qu'il y avait un problème avec la mesure LC-MS. Comme les échantillons étaient dupliqués entre les méthodes de mesures, nous avons décidé d'étudier la corrélation du  $FER_{HDL}$  entre les deux méthodes avec une corrélation de Pearson (Figure 22). La corrélation entre les méthodes pour la mesure de  $FER_{HDL}$  était révélatrice : le coefficient de détermination de la corrélation entre les témoins n'était pas mauvais ( $r^2 = 0,530$ ), mais le coefficient de détermination entre les cas lui n'était que de  $r^2 = 0,236$ . Lorsque l'on combinait les cas et les témoins, le  $r^2$  était en conséquence de 0,312.



**Figure 22.** Corrélation de Pearson entre les mesures de  $FER_{HDL}$  des donneurs de la cohorte Biobanque ICM par test enzymatique et par LC-MS. Les valeurs de  $FER_{HDL}$  négative n'ont pas été utilisées. N=39 pour témoins et N=45 pour cas.

Les résultats de la corrélation ayant fortement suggéré qu'il y avait eu un problème avec la méthode LC-MS, nous avons tenté d'en isoler la cause. Comme le cholestérol libre ne s'ionise pas très efficacement (100), notre hypothèse principale était que le cholestérol libre était saturé en source dans le LC-MS. Afin de tester cette hypothèse, nous avons injecté des quantités variables d'un des échantillons dans le LC-MS afin d'essayer de déterminer le point de saturation du CL (Figure 23). Lors des mesures LC-MS pour la cohorte Biobanque ICM nous avons chargé 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon. Or, la linéarité de l'abondance du cholestérol libre est ambiguë pour cette quantité. En effet, bien que la courbe semble linéaire jusqu'à cette quantité, les quantités d'échantillons suivantes montrent une saturation de l'abondance. L'échantillon choisi pour ce test était dans la moyenne des échantillons en termes de quantité de cholestérol libre (déterminé par la méthode enzymatique), ce qui suggère que la plupart des échantillons sont à la limite de la saturation. À cause de cela, nous avons conclu que les mesures de  $\text{FER}_{\text{HDL}}$  avec la méthode LC-MS n'étaient pas fiables, risquant d'être sous-estimées par rapport aux mesures de  $\text{FER}_{\text{HDL}}$  enzymatiques. Ce problème de saturation pourrait expliquer pourquoi le groupe témoin (qui possède une plus grande concentration plasmatique en cholestérol libre que les cas) affiche un  $\text{FER}_{\text{HDL}}$  plus bas avec la méthode LC-MS qu'avec la méthode enzymatique.



**Figure 23.** Abondance du cholestérol libre en fonction de la quantité d'échantillon chargé sur le LC-MS. Chaque quantité a été testée en monoplicat.

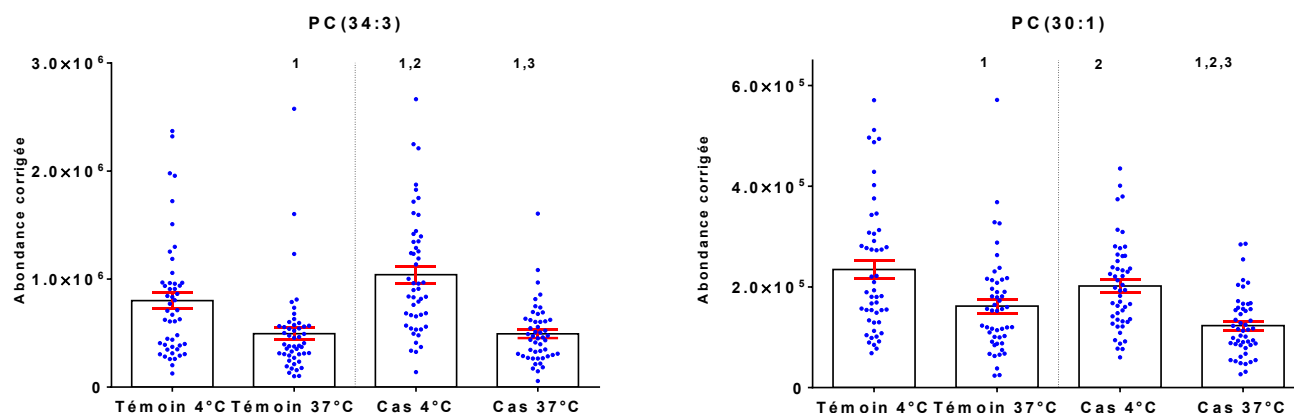


Malgré ce problème avec le cholestérol libre, une entité très abondante, l'avantage de la méthode LC-MS est la possibilité de mesurer des changements au niveau de tous les lipides simultanément. Nous avons donc tenté d'identifier des biomarqueurs potentiels de l'activité LCAT dans notre cohorte et de déterminer l'impact du statut coronarien sur ces changements. Pour ce faire, nous avons analysé de façon non ciblée l'effet de l'incubation sur les lipides (soit l'abondance à 37°C vs 4°C, identifié comme fold change) chez les témoins et chez les cas et nous avons ensuite comparé le FC des groupes ensemble. Comme pour les autres expériences, les changements de signaux des entités suite à l'incubation ont été comparés et les entités ayant un  $FC \geq 1,2$  et une valeur  $p \leq 0,05$  (corrigée pour FDR 5%) ont été conservés. Pour la comparaison entre les groupes, tous les FC des lipides identifiés ont été comparés ensemble (Tableau XIII). Dans l'ensemble, plus de lipides avaient un  $FC \geq 1,2$  chez les cas que chez les témoins (23 pour les cas contre 16 pour les témoins), mais des 23 lipides identifiés dans le Tableau XIII, seuls quelques-uns présentaient un FC très différent entre les cas et les témoins. De ces 23 lipides, 6 avaient une différence de FC d'au moins 0,2 (20%) entre les cas et les témoins : les PC(30 :1), PC(34:3), DG(32:1), DG(34:1), DG(34:2) et le DG(36:5). Étonnamment, plus de la moitié des lipides les plus modifiés par l'incubation chez les cas sont des DG, qui ne sont pas des substrats de la LCAT. Ceci implique qu'une autre lipase présente dans le plasma déplété en lipoprotéines à apoB (possiblement HL ou la LPL, tel que discuté plus haut) est possiblement modulée différemment entre les cas et les témoins. Afin de valider ces 6 lipides, nous avons tracé des graphiques de l'abondance de ceux-ci pour observer en détail leur abondance et les changements causés par l'incubation.

**Tableau XIII. Espèces lipidiques modifiées en abondance par l'incubation du plasma chez les groupes témoins et cas de la cohorte Biobanque ICM.** La valeur limite pour l'amplitude du changement d'abondance était de  $\geq 1,2$  (1,2x plus ou 1,2x moins) et la signification statistique a été établie à  $p \leq 0,05$  (FDR 5%) (N=5). Un FC négatif indique une perte d'abondance pendant l'incubation.

|                                       | Témoin   |       | Cas   |          |
|---------------------------------------|----------|-------|-------|----------|
|                                       | Valeur p | FC    | FC    | Valeur p |
| <b>Lysophosphatidylcholines (LPC)</b> |          |       |       |          |
| LPC(15:0)                             | 6,37E-06 | 1,14  | 1,24  | 2,86E-10 |
| LPC(16:0)                             | 8,44E-09 | 1,19  | 1,24  | 6,27E-11 |
| LPC(17:0)                             | 1,60E-08 | 1,17  | 1,26  | 7,63E-11 |
| LPC(18:0)                             | 1,73E-07 | 1,19  | 1,26  | 7,63E-11 |
| LPC(18:3)                             | 1,95E-03 | -1,20 | -1,36 | 6,27E-11 |
| <b>Lysoplasmalogènes (LPC O-)</b>     |          |       |       |          |
| LPC(O-18:2)                           | 1,99E-01 | 1,11  | 1,21  | 3,78E-02 |
| <b>Phosphatidylcholines (PC)</b>      |          |       |       |          |
| PC(30:0)                              | 3,27E-09 | -1,34 | -1,41 | 2,83E-12 |
| PC(30:1)                              | 1,02E-05 | -1,47 | -1,70 | 1,60E-08 |
| PC(31:0)                              | 5,03E-07 | -1,22 | -1,25 | 3,54E-09 |
| PC(31:1)                              | 4,18E-03 | -1,23 | -1,26 | 4,16E-03 |
| PC(32:1)                              | 3,11E-09 | -1,42 | -1,52 | 7,45E-13 |
| PC(32:2)                              | 3,27E-09 | -1,21 | -1,20 | 6,35E-07 |
| PC(33:1)                              | 1,73E-05 | -1,19 | -1,21 | 1,93E-06 |
| PC(34:3)                              | 4,23E-05 | -1,66 | -2,11 | 2,55E-11 |
| <b>Plasmalogènes (PC O-)</b>          |          |       |       |          |
| PC(O-42:0)                            | 1,86E-07 | -1,64 | -1,74 | 9,41E-11 |
| <b>Diacylglycérols (DG)</b>           |          |       |       |          |
| DG(32:1)                              | 1,28E-06 | 1,53  | 1,82  | 1,47E-09 |
| DG(34:1)                              | 4,88E-09 | 1,53  | 1,80  | 7,45E-13 |
| DG(34:2)                              | 2,68E-07 | 1,44  | 1,66  | 1,74E-12 |
| DG(36:2)                              | 6,13E-06 | 1,20  | 1,30  | 7,21E-10 |
| DG(36:3)                              | 1,07E-06 | 1,22  | 1,37  | 1,42E-08 |
| DG(36:4)                              | 1,55E-03 | 1,26  | 1,29  | 9,73E-03 |
| DG(36:5)                              | 2,99E-07 | 1,41  | 1,71  | 1,84E-10 |
| DG(O-34:1)                            | 8,62E-04 | 1,33  | 1,20  | 1,20E-02 |

Les PC(30:1) et PC(34:3) étaient les plus prometteuses comme biomarqueurs potentiels liés à la LCAT (Figure 24) et elles présentaient chacune des profils différents. D'abord, l'abondance de la PC(30:1) était similaire entre les témoins et les cas à 4°C, mais les effets de l'incubation étaient plus forts chez les cas (FC = -1,70,  $p = 1,60E-08$ ) que chez les contrôles (FC = -1,46,  $p = 1,02E-05$ ). De plus, l'ampleur du changement causé par l'incubation était assez importante pour les cas et pour les témoins, ce qui en facilite la mesure. La PC(30:1) est donc un biomarqueur potentiel, mais les résultats de la PC(34:3) sont encore plus intéressants.

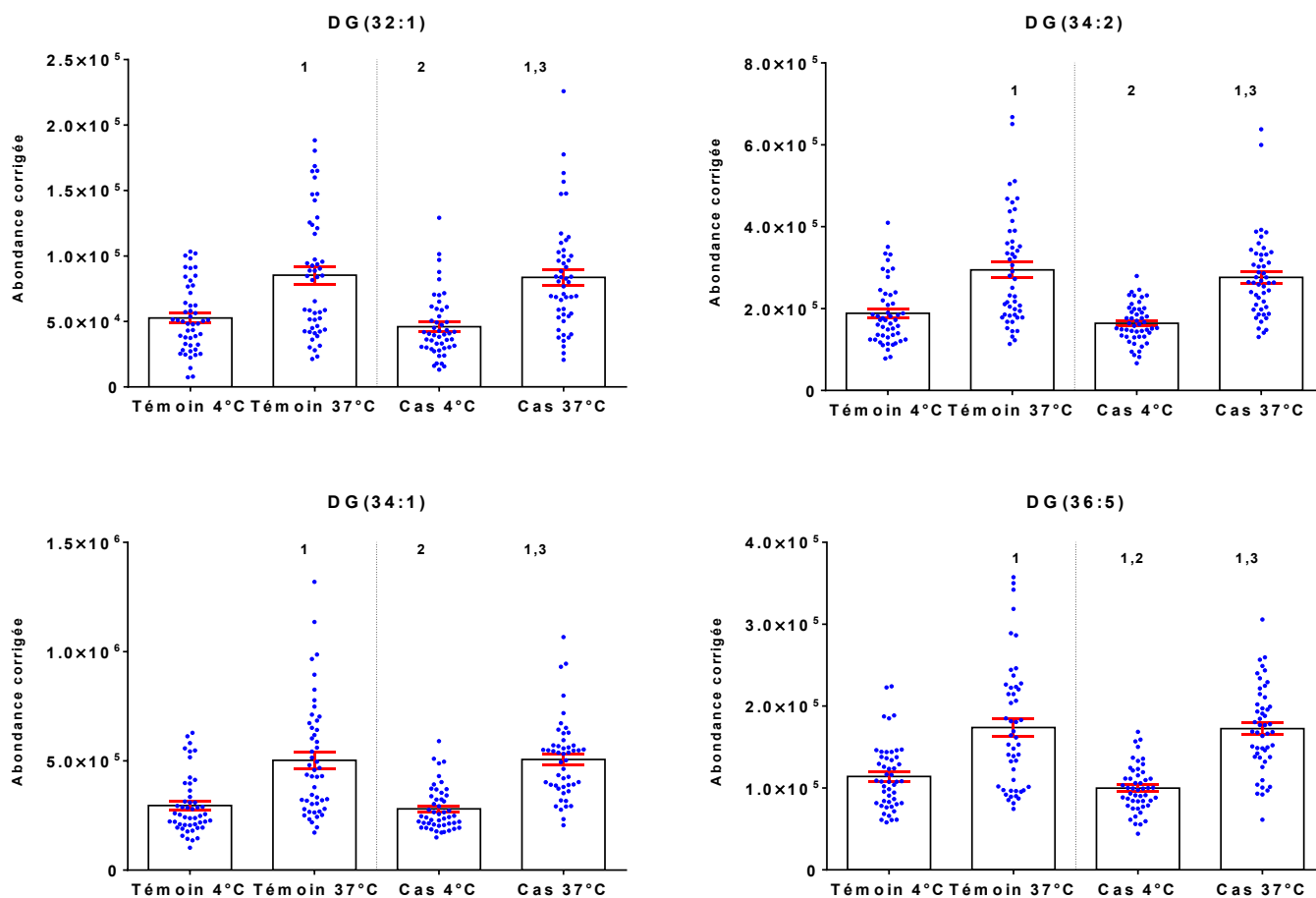


**Figure 24. Comparaison de l'abondance des PC(34:3) et PC(30:1) dans la cohorte Biobanque ICM entre les cas et témoins à 4°C et 37°C.** N=49 pour chacune des conditions. Moyennes  $\pm$  SEM. Les chiffres indiquent une différence significative (anova 2 facteurs, comparaisons multiple de Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre les bandes associées (1 à 4, de gauche à droite)

Le profil de l'abondance de la PC(34:3) était particulièrement intéressant. Cette PC était 23% plus abondante ( $p = 0.0323$ ) chez les cas que chez les contrôles à 4°C, toutefois, à 37°C son abondance était presque identique entre les groupes ( $p = 0,9730$ ). Parmi tous les lipides identifiés au Tableau XIII, cette PC était celle ayant les FC les plus importants suite à

l'incubation ( $FC = -1,66$ ,  $p = 4,23E-05$  pour les contrôles et  $FC = -2,10$ ,  $p = 2,55E-11$  pour les cas), ce qui indique que la LCAT semblait particulièrement active sur le PC(34:3). La PC(34:3) semble donc être un des meilleurs biomarqueurs potentiels de l'activité LCAT parmi les lipides que nous avons identifiés. La diminution moyenne d'abondance observée chez les cas était de 52,6% ( $p \leq 0,0001$ ), alors qu'elle était de 38,2% ( $p = 0,0003$ ) chez les témoins, soit une différence de 27,4%. Il est intéressant de noter que la PC(34:3) était aussi celle dont l'abondance était la plus diminuée lors de l'incubation du plasma groupé (Tableau VII). Finalement, la variabilité de l'abondance de cette PC entre les patients était moins grande après l'incubation, ce qui implique que l'effet de l'incubation est variable selon les patients. Cette variabilité dans l'ampleur de l'effet de l'incubation n'est pas favorable à l'utilisation du PC(34:3) comme biomarqueur car elle peut compliquer l'établissement d'une valeur de référence.

Outre ces deux phospholipides, qui sont des substrats potentiels de la LCAT, quatre DG sont aussi modifiées par l'incubation et ils avaient tous un profil similaire (Figure 25) : leur abondance à 4°C était légèrement plus faible chez les cas que chez les témoins (mais pas assez pour que cela soit statistiquement significatif, sauf pour le DG(36:5),  $p = 0,451$ ) tandis que leur abondance à 37°C était similaire entre les cas et les témoins. À cause de cette petite différence d'abondance à 4°C, l'effet de l'incubation sur ces DG était plus important chez les cas, ce qui explique pourquoi ces lipides ont été sélectionnés avec les critères de sélection que nous avons utilisés. En pratique cependant, les différences entre les cas et les témoins sont tellement faibles que ces DG ne feraient pas des bons biomarqueurs potentiels. Il est toutefois intéressant de remarquer que la distribution des abondances était beaucoup plus étendue après l'incubation, la modulation de ces DG par l'incubation était donc très variable entre les individus, comme pour le PC(34:3).



**Figure 25. Comparaison de l'abondance des DG(32:1), DG(O-34:1), DG(34:2) et DG(36:5) dans la cohorte Biobanque ICM entre les cas et témoins à 4°C et 37°C. N=49 pour chacune des conditions. Moyennes  $\pm$  SEM. Les chiffres indiquent une différence significative (anova 2 facteurs, comparaisons multiple de Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre les bandes associées (1 à 4, de gauche à droite)**

## **4 Discussion**

### **4.1 Approche expérimentale**

Avec ce projet, nous avons tenté de faire la preuve de concept d'une méthode de LC-MS pour l'étude de la LCAT, ce qui est, à notre connaissance, n'avait jamais été tenté avec cette enzyme. Les méthodes de LC-MS sont complexes, et il existe beaucoup de variations entre les laboratoires dans le choix du type d'extraction, des solvants utilisés, des appareils, mais aussi des méthodes de mesure.

Dans le cadre de ce projet, nous avons privilégié l'utilisation de la méthode MTBE pour l'extraction, car elle comporte plusieurs avantages sur les méthodes traditionnelles comme l'extraction de Folch. Entre autres, elle nécessite peu de chloroforme, un avantage pour la sécurité des manipulateurs, et les lipides sont extraits dans la phase supérieure, ce qui facilite la récupération et diminue le risque de contamination avec les molécules hydrosolubles.

Ensuite, nous avons privilégié un appareil LC-MS de type Q-TOF, car ce genre d'appareil est très sensible et permet la détection d'une très grande quantité de molécules. Pour une preuve de concept et la recherche biomarqueurs potentiel par analyse non-ciblée, le Q-TOF est idéal (101), mais pour la validation de la méthode, un appareil de LC-MS/MS de type LC-MS-MS (triple quadripôles) serait probablement plus approprié. Les analyses par MS sont plus rapides et permettent de mieux discriminer entre les molécules similaires, et ce genre d'appareil est aussi parfait pour l'analyse ciblée d'une sélection de molécules d'intérêts et de standard internes appropriés, ce qui est essentiel pour une étape de validation.

### **4.2 Analyse du cholestérol libre**

Le choix du MTBE et de nos paramètres d'analyse LC-MS comporte aussi des avantages dans le cadre de cette étude de la LCAT. Le cholestérol libre est une molécule importante dans l'activité de l'enzyme, mais il est typiquement difficile à extraire et à

analyser en LC-MS. Avec notre méthodologie, nous avons réussi à atteindre 87% de recouvrement pour le cholestérol libre, avec un CV de moins de 10%, et ce sans étapes additionnelles (dérivatisation ou autre), ce qui est prometteur à cette étape si du projet. Les paramètres de recouvrement devront cependant être évalués plus en détail, par exemple en modifiant le type de matrice, lors d'une validation éventuelle de la méthode.

Malgré l'apparente efficacité de notre méthode pour l'analyse du cholestérol libre, il est vite apparu que l'analyse du cholestérol reste complexe. En effet, le cholestérol libre en quantité typiquement retrouvée dans nos échantillons était à la limite de la saturation du signal. Cette situation est devenue apparente lors de l'utilisation de courbe de calibration pour le dosage du cholestérol, où les courbes se comportaient différemment selon les lots d'extraction. Ce problème de saturation a compliqué le dosage du cholestérol libre en LC-MS et il est difficile d'évaluer la validité de ce résultat, en particulier vu la différence importante de la quantité dosée (65% de plus pour la méthode LC-MS) entre la méthode enzymatique et LC-MS. Si ce biais entre les méthodes est causé par un problème de saturation (ce qui est très probable), celui-ci pourrait possiblement être évité en diluant les échantillons ou en injectant une plus petite quantité d'échantillons dans le LC-MS. La question du cholestérol libre nécessite donc plus de travail avant d'avoir une réponse claire sur l'efficacité de notre méthode pour son dosage. Cependant, malgré les problèmes de dosage, le fait que notre méthode permette la détermination d'un  $FER_{HDL}$  similaire à celui déterminé avec la méthode enzymatique (18,1 %, contre 17,4 % en enzymatique) reste un point positif pour notre. Sinon, nous n'avons pas détecté de problèmes de saturation avec d'autres molécules que le cholestérol libre dans nos échantillons, mais une attention particulière devra être portée lors de la validation de la méthode sur des lipides comme les esters de cholestérol ou les phospholipides, qui sont naturellement très abondants sur les HDL et donc plus à risque de saturation du signal. Nous avons certains doutes sur la linéarité de la réponse avec les esters de cholestérol, qui ont tendance à se fragmenter massivement en source.

La question peut toutefois se poser sur l'utilité d'une méthode LC-MS pour l'analyse du cholestérol libre, alors que la méthode enzymatique est plus rapide, moins complexe et

moins couteuse. Si le seul but est de mesurer le cholestérol libre pour évaluer l'activité de la LCAT, alors il est évident qu'une méthode enzymatique est plus appropriée. Toutefois, la LC-MS est beaucoup plus polyvalente et plus sensible qu'une méthode enzymatique, ce qui permet, par exemple, de mesurer l'abondance d'espèces rares de cholestérol, où comme on l'a vu dans cette étude, de mesurer les espèces de CE produits par l'action de la LCAT.

### **4.3 Recherche de biomarqueurs candidats**

L'avantage que procure la méthode LC-MS reste cependant la détection un nombre important de molécules dans le plasma et la possibilité de suivre les effets de la LCAT sur celles-ci. L'étude approfondie des lipides (lipidomique) modifiés lors de l'incubation de nos plasmas groupés nous a permis d'identifier plusieurs lipides affectés par l'incubation du plasma, et donc potentiellement par la LCAT. Évidemment, le changement d'abondance du cholestérol libre reste la mesure la plus spécifique de l'activité de la LCAT, cette enzyme étant la seule capable de l'estérifier dans le plasma. Toutefois, l'augmentation de l'abondance des deux LPC les plus abondantes sur les HDL, les LPC(18:0) et LPC(16:0), semble aussi être un bon marqueur de l'activité de la LCAT, ce qui est soutenu par les résultats obtenus avec l'ajout de LCATrh au plasma. L'abondance de ces deux LPC augmentait respectivement de 49% et 41% suivant l'incubation du plasma normal, et cet effet était fortement dépendant de la dose de LCATrh. L'ajout de LCATrh a aussi permis d'éliminer certains candidats, puisque l'on a pu déterminer que le changement d'abondance du DG(16:0/18:1) suite à l'incubation du plasma était indépendant de celle-ci. Il a cependant été plus difficile d'identifier des marqueurs intéressants chez les deux autres espèces lipidiques impliquées dans la réaction de la LCAT, les PC et les CE. Ces lipides sont très abondants dans les HDL, il peut donc être difficile de voir les changements provoqués par l'incubation sans utiliser de marqueurs isotopiques. L'utilisation de cholestérol deutéré nous a fourni une piste quant aux type des esters de cholestérol les plus formés par la LCAT (CE18:2, CE18:1 et CE20:4), et il n'est pas exclu qu'une étude de validation plus robuste mette à jour certains de ces lipides comme des marqueurs utiles de l'activité de la LCAT.



Un résultat nous a particulièrement étonné lors de l'analyse de l'effet de la LCATrh sur le plasma; l'abondance de la PC(16:0/18:0) était augmenté de 841% à la dose de 72 µg/mL de rhLCAT, alors que les PC sont normalement des substrats de la LCAT. En consultant la littérature, il est apparu que cette PC était probablement formée par une action de réacylation des LPC par la LCAT (67, 99), réaction rare, mais possiblement favorisée par le milieu fermé de la réaction et l'épuisement du substrat principal, le cholestérol libre. De plus, conformément à la littérature (60, 61), il semble que la LCAT est plus active sur les PC ayant un acide gras contenant de 16 à 20 carbones en position sn-2. Plus spécifiquement, les acides gras de type 16:1, 18:1, 18:2 et 20:4 semblent particulièrement hydrolysés par la LCAT. Ce genre de découvertes démontre bien l'intérêt d'une méthode -omique, qui permet la mesure d'une quantité importante de molécules, pour l'étude de l'activité d'une protéine.

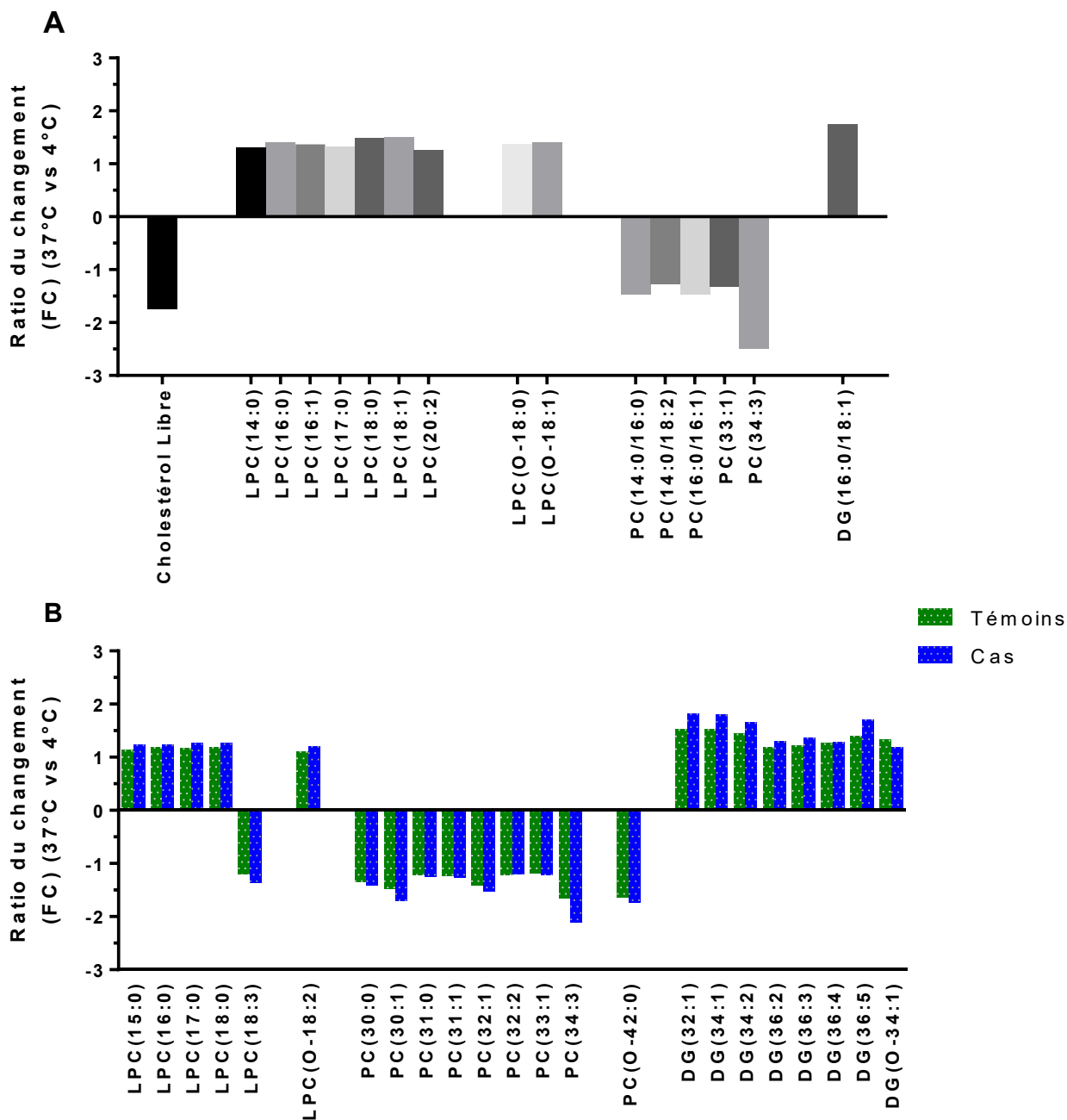
#### **4.3.1 Biomarqueurs candidats dans la cohorte Biobanque ICM**

Les tests avec le plasma groupé ont permis d'ouvrir la voie vers une étude de l'activité LCAT dans une cohorte cas-témoins de la Biobanque de l'ICM. Malheureusement, il s'est avéré après l'analyse que la cohorte avait été mal balancée, et le ratio homme/femme était inversé entre les cas et les témoins, ce qui a pu avoir un effet sur la quantité de lipides identifiés pendant les analyses. Malgré tout, nous avons quand même tenté d'identifier des biomarqueurs potentiel de la maladie cardiovasculaire en lien avec la LCAT chez cette cohorte.

Les échantillons d'une cohorte sont naturellement plus hétérogènes que ceux du plasma groupé, et ils proviennent d'une population très différente. Le plasma groupé provient d'un centre de prélèvement aux États-Unis et est formé d'un groupe de donneurs adultes en santé. La Biobanque ICM elle est formée principalement de patients âgés et malades, puisque pour la plupart patients de l'ICM. Malgré ces différences, l'activité de la LCAT était très similaire entre ces échantillons. Les témoins et les cas de la Biobanque ICM avaient respectivement un FER<sub>HDL</sub> de 20,5% et 17,7%, ce qui est très similaire à celui du

plasma groupé (17,4%). Plusieurs lipides étaient légèrement modifiés par l'incubation dans les deux cohortes, mais seules quelques-uns présentaient des comportements différents entre les cas et les témoins. Après analyse, deux PC (PC(30:1) et PC(34:3)) présentaient des différences entre les cas et les témoins, et la PC(34:3) semblait particulièrement intéressante comme biomarqueur potentiel. Cette PC était plus abondante avant l'incubation chez les cas tout en étant plus affectée par la LCAT chez les cas que chez les témoins. Cette découverte est toutefois très préliminaire et la valeur du PC(34:3) est encore inconnue. Ce biomarqueur potentiel devra être validé lors d'une nouvelle étude avec une autre cohorte Biobanque ICM, cette fois mieux contrôlée. Pour cette étude, nous utiliserions probablement un appareil de type LC-MS QTOF pour la découverte de biomarqueurs potentiel et un LC-MS-QQQ pour la validation de ceux-ci, car il est plus approprié pour la validation, tel que mentionné plus haut.

Outre les PC, les changements au niveau d'une autre classe de lipides, les DG, nous ont surpris, car ce ne sont pas des substrats ni des produits de la LCAT. Les tests de dose-réponse avec la LCATrh avaient permis de confirmer que ces lipides étaient modifiés indépendamment de l'action de notre protéine, et l'augmentation de leur abondance est possiblement le résultat de l'action de lipases plasmatiques comme la HL ou la LPL. Les cas avaient une augmentation légèrement supérieure à celle des contrôles suite à l'incubation, mais cette différence est tellement mineure pour les 4 DG identifiés que ce ne seraient probablement pas de bons biomarqueurs.



**Figure 26.** Synthèse du changement d'abondance des lipides du plasma déplété en lipoprotéines contenant de l'apoB suite à une incubation de 2 heures à 37°C. **A:** Plasma groupé. **B:** Plasma de la Biobanque ICM. Un FC positif indique une augmentation de l'abondance d'un lipide et un FC négatif une diminution.

## 5 Conclusion

Bien que la spectrométrie de masse soit une technologie relativement mature, son application à la lipidomique est assez récente. Avec notre étude, nous avons fait la preuve de concept de l'utilisation d'une méthode LC-MS pour l'analyse de l'activité de la LCAT. À notre connaissance, nous sommes les premiers à étudier en détail l'effet de la LCAT sur le lipidome du plasma déplété en lipoprotéines contenant de l'apoB à l'aide de la spectrométrie de masse. La méthode LC-MS semble efficace pour mesurer l'activité de la LCAT à l'aide du cholestérol libre, les mesures de  $FER_{HDL}$  étant similaires à celles de la méthode enzymatique. De plus, l'analyse des plasma groupé avec et sans ajout de LCATrh ont permis d'identifier les LPC(16:0) et LPC(18:0) comme de bon marqueurs potentiel de l'activité de la LCAT. L'on a même observée une activité rare de réacylation des LPC par la LCAT lors des tests avec la LCATrh. Ce genre de découvertes fortuites est favorisé par l'abondance des données obtenues avec la LC-MS, et cela démontre bien l'avantage du choix de cette technologie. Finalement, bien que notre étude sur la Biobanque ICM soit très préliminaire, nous avons réussi à identifier le PC(34:3) comme biomarqueur potentiel de la maladie cardiovasculaire, ce qui démontre l'utilité d'une méthode LC-MS pour l'analyse des plasmas humains. La prochaine étape serait de répéter l'étude dans la Biobanque ICM, mais cette fois avec une cohorte mieux contrôlée, ce qui devrait nous permettre d'améliorer la puissance de nos analyses en éliminant certains facteurs confondants, tel que les différences lipidiques entre les hommes et les femmes. Une fois un certain nombre de biomarqueurs identifié, ceux-ci pourraient être validés avec une méthodologie impliquant un appareil de type LC-MS-QQQ.

L'utilisation de la LC-MS pour l'étude de l'activité de protéines plasmatiques est une idée relativement nouvelle, et un protocole similaire au notre pourrait être appliqué à l'étude de l'activité d'autres protéines plasmatiques impliquées dans l'athérosclérose, telles que la LPL ou la EL. Il serait aussi envisageable d'utiliser cette méthodologie dans l'étude de l'activité de ces protéines dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*. Il faut toutefois se rappeler que la LC-MS est une technologie complexe et coûteuse, bien que ces points négatifs soient quelque peu compensés par la polyvalence et la puissance des analyses possibles.

# Bibliographie

1. Mortalité due aux maladies cardiovasculaires [Web article]. : Conference Board Canada; 2015 [modifié le 1 février 2015; cité le 25 juin 2017]. Disponible: <http://www.conferenceboard.ca/hcp/provincial-fr/health-fr/heart-fr.aspx#ftn1-ref>
2. George SJ, Lyon C. Pathogenesis of Atherosclerosis. Atherosclerosis: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010. p. 1-20.
3. (WHO) WHO. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO, 2011.
4. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(7):517-26.
5. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. New England Journal of Medicine. 2012;367(22):2089-99.
6. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. New England Journal of Medicine. 2017;376(20):1933-42.
7. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. New England Journal of Medicine. 2007;357(21):2109-22.
8. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. New England Journal of Medicine. 2017;377(13):1217-27.
9. Francis GA. Chapter 15 - High-Density Lipoproteins: Metabolism and Protective Roles Against Atherosclerosis. Dans: Ridgway ND, McLeod RS, rédacteurs. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition). Boston: Elsevier; 2016. p. 437-57.
10. Bonow R, Mann D, Zipes D, Libby P. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 9th edition. 9<sup>e</sup> éd. Philadelphia: Elsevier Science; 2011.
11. Huff MW, Daugherty A, Lu H. Chapter 18 - Atherosclerosis. Dans: Ridgway ND, McLeod RS, rédacteurs. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition). Boston: Elsevier; 2016. p. 519-48.
12. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chaman JM, Davidson SW. Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components. Dans: Eckardstein Av, Kardassis D, rédacteurs. High Density Lipoproteins: Springer; 2015. p. 5-52.
13. Gao X, Yuan S, Jayaraman S, Gursky O. Role of Apolipoprotein A-II in the Structure and Remodeling of Human High-Density Lipoprotein (HDL): Protein Conformational Ensemble on HDL. Biochemistry. 2012;51(23):4633-41.
14. Glomset JA. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. Biochim Biophys Acta. 1962;65:128-35.
15. Randolph GJ, Miller NE. Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. J Clin Invest. 2014;124(3):929-35.
16. Eckardstein Av, Kardassis D. High Density Lipoproteins. 1<sup>e</sup> éd. Eckardstein Av, Kardassis D, rédacteurs: Springer; 2015.

17. Röhl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion(). *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1831(11):1626-33.
18. Brundert M, Heeren J, Merkel M, Carambia A, Herkel J, Groitl P, et al. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *Journal of Lipid Research*. 2011;52(4):745-58.
19. Serna J, Garcia-Seisdedos D, Alcazar A, Lasuncion MA, Busto R, Pastor O. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Phys Lipids*. 2015;189:7-18.
20. McLeod RS, Yao Z. Chapter 16 - Assembly and Secretion of Triglyceride-Rich Lipoproteins. Dans: Ridgway ND, McLeod RS, rédacteurs. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*. Boston: Elsevier; 2016. p. 459-88.
21. Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *The American Journal of Cardiology*. 2000;86(12):5-10.
22. Kassner U, Schlabs T, Rosada A, Steinhagen-Thiessen E. Lipoprotein(a) – An independent causal risk factor for cardiovascular disease and current therapeutic options. *Atherosclerosis Supplements*. 2015;18:263-7.
23. Man LC, Kelly E, Duffy D. Targeting Lipoprotein (a): an Evolving Therapeutic Landscape. *Current Atherosclerosis Reports*. 2015;17(5):25.
24. Brunner C, Lobentanz E-M, Pethö-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, et al. The Number of Identical Kringle IV Repeats in Apolipoprotein(a) Affects Its Processing and Secretion by HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(50):32403-10.
25. Marcovina SM, Albers JJ. Lipoprotein (a) measurements for clinical application. *Journal of Lipid Research*. 2016;57(4):526-37.
26. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
27. Child G, Jrockley. Stages of endothelial dysfunction in atherosclerosis. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endo\\_dysfunction\\_Athero.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG): Wikipedia, 2006.
28. Simionescu M, Sima AV. Morphology of Atherosclerotic Lesions. Dans: Wick G, Grundtman C, rédacteurs. *Inflammation and Atherosclerosis*. New York: SpringerWienNewYork; 2012. p. 19-37.
29. Favari E, Chroni A, Tietge UJF, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. Dans: Eckardstein Av, Kardassis D, rédacteurs. *High Density Lipoproteins: Springer*; 2015. p. 181-206.
30. Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24020-9.
31. Hill SA, McQueen MJ. Reverse Cholesterol Transport—A Review of the Process and Its Clinical Implications. *Clinical Biochemistry*. 1997;30(7):517-25.
32. Ossoli A, Pavanello C, Calabresi L. High-Density Lipoprotein, Lecithin: Cholesterol Acyltransferase, and Atherosclerosis. *Endocrinology and Metabolism*. 2016;31(2):223-9.
33. Ono K. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *J Cardiol*. 2012;60(5):339-43.
34. Schwartz CC, VandenBroek JM, Cooper PS. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *Journal of Lipid Research*. 2004;45(9):1594-607.

35. Sperry WM. Cholesterol esterase in blood. *J Biol Chem*. 1935;111:467-78.
36. Norum KR, Gjone E. Familial plasma lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Biochemical study of a new inborn error of metabolism. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 1967;20:231-43.
37. Dobiasova M, Schutzova M. Cold labelled substrate and estimation of cholesterol esterification rate in lecithin cholesterol acyltransferase radioassay. *Physiologia Bohemoslovaca*. 1986;35(4):319-27.
38. Segrest JP, Jones MK, Catta A, Thirumuruganandham SP. A robust all-atom model for LCAT generated by homology modeling. *J Lipid Res*. 2015;56(3):620-34.
39. Piper DE, Romanow WG, Gunawardane RN, Fordstrom P, Masterman S, Pan O, et al. The high-resolution crystal structure of human LCAT. *J Lipid Res*. 2015;56(9):1711-9.
40. Shamburek RD, Bakker-Arkema R, Shamburek AM, Freeman LA, Amar MJ, Auerbach B, et al. Safety and Tolerability of ACP-501, a Recombinant Human Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, in a Phase 1 Single-Dose Escalation Study. *Circ Res*. 2016;118(1):73-82.
41. Shamburek RD, Bakker-Arkema R, Auerbach BJ, Krause BR, Homan R, Amar MJ, et al. Familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency: First-in-human treatment with enzyme replacement. *J Clin Lipidol*. 2016;10(2):356-67.
42. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2000;1529:245-56.
43. Hoeg JM, Vaisman BL, Demosky SJJ, Meyn SM, Talley GD, Hoyt RFJ, et al. Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Overexpression Generates Hyperalpha-lipoproteinemia and a Nonatherogenic Lipoprotein Pattern in Transgenic Rabbits. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(8):4396-402.
44. O K, Hill JS, Wang X, McLeod R, Pritchard PH. Lecithin:cholesterol acyltransferase: role of N-linked glycosylation in enzyme function. *Biochemical Journal*. 1993;294(3):879-84.
45. Qu SJ, Fan HZ, Blanco-Vaca F, Pownall HJ. Effects of site-directed mutagenesis on the N-glycosylation sites of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *31aug1993*;v. 32.
46. Carlson LA. Fish eye disease: a new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia Clinical and laboratory studies in two afflicted families. *European Journal of Clinical Investigation*. 1982;12(1):41-53.
47. Norum K, Gjone E. Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1967;144(3):698-700.
48. Calabresi L, Simonelli S, Gomaraschi M, Franceschini G. Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):299-306.
49. Calabresi L, Pisciotto L, Costantin A, Frigerio I, Eberini I, Alessandrini P, et al. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(9):1972-8.
50. Carlson L, Holmquist L. Evidence for deficiency of high density lipoprotein lecithin: cholesterol acyltransferase activity (alpha-LCAT) in fish eye disease. *Acta Med Scand*. 1985;218(2):189-96.

51. Santamarina-Fojo S, Hoeg† JM, Assmann G, Bryan Brewer H. Lecithin Cholesterol Acyltransferase Deficiency and Fish Eye Disease. Dans: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, et al., rédacteurs. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2014.
52. Saeedi R, Li M, Frohlich J. A review on lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Clin Biochem. 2015;48(7-8):472-5.
53. Sorci-Thomas MG, Bhat S, Thomas MJ. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. Clin Lipidol. 2009;4(1):113-24.
54. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin: cholesterol acyltransferase – from biochemistry to role in cardiovascular disease. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2009;16(2):163-71.
55. Ossoli A, Neufeld EB, Thacker SG, Vaisman B, Pryor M, Freeman LA, et al. Lipoprotein X Causes Renal Disease in LCAT Deficiency. PLoS One. 2016;11(2):e0150083.
56. Baass A, Wassef H, Tremblay M, Bernier L, Dufour R, Davignon J. Characterization of a new LCAT mutation causing familial LCAT deficiency (FLD) and the role of APOE as a modifier gene of the FLD phenotype. Atherosclerosis. 2009;207(2):452-7.
57. Brousseau ME, S. S-F, Vaisman BL, Applebaum-Bowden D, Berard AM, Talley GD, et al. Overexpression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in cholesterol-fed rabbits: LDL metabolism and HDL metabolism are affected in a gene dose-dependent manner. J Lipid Res. 1997;38:2537-47.
58. Dobiasova M, Frohlich J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain the high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio. Physiol Res. 1998;47:387-97.
59. Jonas A. Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. Progress in Lipid Research. 1998;37(4):209-34.
60. Christiaens B, Vanloo B, Gouyette C, Van Vynckt I, Caster H, Taveirne J, et al. Headgroup specificity of lecithin cholesterol acyltransferase for monomeric and vesicular phospholipids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2000;1486(2-3):321-7.
61. Grove D, Pownall HJ. Comparative specificity of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase from ten animal species. Lipids. 1991;26:416-20.
62. Liu M, Bagdade JF, Subbaiah PV. Specificity of lecithin:cholesterol acyltransferase and atherogenic risk: comparative studies on the plasma composition and in vitro synthesis of cholesteryl esters in 14 vertebrate species. J Lipid Res. 1995;36:1813-24.
63. Chen C-H, Albers JJ. Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1982;107(3):1091-6.
64. Martin DD, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN. Apolipoprotein A-I assumes a "looped belt" conformation on reconstituted high density lipoprotein. J Biol Chem. 2006;281(29):20418-26.
65. Gu X, Wu Z, Huang Y, Wagner MA, Baleanu-Gogonea C, Mehl RA, et al. A Systematic Investigation of Structure/Function Requirements for the Apolipoprotein A-I/Lecithin



Cholesterol Acyltransferase Interaction Loop of High-density Lipoprotein. *J Biol Chem.* 2016;291(12):6386-95.

66. Vitali C, Wellington CL, Calabresi L. HDL and cholesterol handling in the brain. *Cardiovascular Research.* 2014;103(3):405-13.

67. Liu M, Subbaiah PV. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(13):6035-9.

68. Goyal J, Wang K, Liu M, Subbaiah PV. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem.* 1997;272(26):16231-9.

69. Vaisman BL, Remaley AT. Measurement of lecithin-cholesterol acyltransferase activity with the use of a Peptide-proteoliposome substrate. *Methods Mol Biol.* 2013;1027:343-52.

70. Dobiasova M, Frohlich JJ. Assays of Lecithin Cholesterol Acyltransferase (LCAT). Dans: Ordovas JM, rédacteur. *Lipoprotein Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 1998. p. 217-30.

71. Davidson WS, Heink A, Sexmith H, Melchior JT, Gordon SM, Kuklenyik Z, et al. The effects of apolipoprotein B depletion on HDL subspecies composition and function. *Journal of Lipid Research.* 2016;57(4):674-86.

72. Dobiasova M, Frohlich JJ. Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clinica Chimica Acta.* 1999;286(1):257-71.

73. Dobiasova M, J. S, Sparks DL, Pritchard PH, Frohlich JJ. Cholesterol esterification rates in very low density lipoprotein- and low density lipoprotein-depleted plasma. Relation to high density lipoprotein subspecies, sex, hyperlipidemia, and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1991;11(1):64-70.

74. Berard AM, Remaley A, Shamburek R, Vaisman BL, Talley G, Paigen B, et al. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase. *Nature Medicine.* 1997;3(7):744-9.

75. Föger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein Corrects Dysfunctional High Density Lipoproteins and Reduces Aortic Atherosclerosis in Lecithin Cholesterol Acyltransferase Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(52):36912-20.

76. Furbee JW, Jr., Parks JS. Transgenic overexpression of human lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in mice does not increase aortic cholesterol deposition. *Atherosclerosis.* 2002;165:89-100.

77. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC, et al. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001;276(18):15090-8.

78. Sakai N, Vaisman BL, Koch CA, Hoyt RF, Meyn SM, Talley GD, et al. Targeted Disruption of the Mouse Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) Gene: GENERATION OF A NEW ANIMAL MODEL FOR HUMAN LCAT DEFICIENCY. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(11):7506-10.

79. Amar MJ, Shamburek RD, Vaisman B, Knapper CL, Foger B, Hoyt RF, Jr., et al. Adenoviral expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in nonhuman primates

leads to an antiatherogenic lipoprotein phenotype by increasing high-density lipoprotein and lowering low-density lipoprotein. *Metabolism*. 2009;58(4):568-75.

80. Calabresi L, Favari E, Moleri E, Adorni MP, Pedrelli M, Costa S, et al. Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):141-6.

81. Holleboom AG, Daniil G, Fu X, Zhang R, Hovingh GK, Schimmel AW, et al. Lipid Oxidation in Carriers of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Gene Mutations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(12):3066-75.

82. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, Petersen W, Rol P, Stalenhoef A, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation*. 2005;112(6):879-84.

83. Haase CL, Tybjaerg-Hansen A, Qayyum AA, Schou J, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(2):E248-56.

84. Rousset X, Vaisman B, Auerbach B, Krause BR, Homan R, Stonik J, et al. Effect of recombinant human lecithin cholesterol acyltransferase infusion on lipoprotein metabolism in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335(1):140-8.

85. Simonelli S, Tinti C, Salvini L, Tinti L, Ossoli A, Vitali C, et al. Recombinant human LCAT normalizes plasma lipoprotein profile in LCAT deficiency. *Biologicals*. 2013;41(6):446-9.

86. Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, of MEDI6012 in Subjects With Stable Coronary Artery Disease [En ligne]. NIH. 2015 [cité. Disponible: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02601560>

87. Watson JT, Sparkman OD. *Introduction to Mass Spectrometry*. 4<sup>e</sup> éd. West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.

88. Agilent. *Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System, Concept Guide*. : Agilent Technologies Inc; 2014.

89. 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS system video : Agilent Technology Inc; 2017 [modifié le Date inconnue; cité le 14 juillet 2017]. Disponible: [http://www.agilent.com/en-us/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-\(q-tof\)-lc-ms/6550vid](http://www.agilent.com/en-us/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-(q-tof)-lc-ms/6550vid)

90. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.

91. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-7.

92. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*. 2008;49(5):1137-46.

93. Lee DY, Kind T, Yoon YR, Fiehn O, Liu KH. Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(28):7275-86.

94. Fang J, Barcelona MJ. Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 1998;33(1):23-35.

95. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
96. Forest A, Ruiz M, Bouchard B, Boucher G, Gingras O, Daneault C, et al. A robust and reproducible comprehensive lipidomic workflow using LC-QTOF optimized for lipid isomer resolution. Application to dissecting sex and age differences in the human serum lipidome. *Manuscrit en préparation*.
97. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res*. 2013;54(11):2950-63.
98. Sun L, Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Mori K, Yasuda T, et al. Plasma Activity of Endothelial Lipase Impacts High-Density Lipoprotein Metabolism and Coronary Risk Factors in Humans. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2014;21(4):313-21.
99. Subbaiah PV, Albers JJ, Chen CH, Bagdade JD. Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(19):9275-80.
100. Brown RJ, Shao F, Baldan A, Albert CJ, Ford DA. Cholesterol efflux analyses using stable isotopes and mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2013;433(1):56-64.
101. Joanne EA, Brian GK, Laura JO. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2014;52(1):18-38.